

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Gestörte Homöostase von Inflammation und  
Antiinflammation bei Risikopatienten nach Herzchirurgie:  
Standardisiertes Immunmonitoring zur Prädiktion  
infektiöser Komplikationen**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Jens-Christian Strohmeyer  
aus Paderborn

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

2. Prof. Dr. med. Michael Bauer

3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. Ulrich Sack

Datum der Promotion: 07.02.2006

## Abstrakt

Kardiochirurgische Eingriffe unter Einsatz der Herzlungenmaschine führen über die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren im allgemeinen zu einer systemischen Entzündung (SIRS). Um das Ausmaß zu begrenzen, wird diese von einer systemischen Gegenregulation (CARS) begleitet, die mit zunehmender Ausprägung den Organismus anfällig für sekundäre Infektionen macht. Septische Krankheitsbilder zählen zu den häufigsten Todesursachen auf operativen Intensivstationen mit jährlichen Kosten in Milliardenhöhe. Gerade die Früherkennung ist klinisch von größter Wichtigkeit. Bei der Suche nach neuen Infektionsmarkern ist das Verständnis der immunologischen Grundlagen eine Grundvoraussetzung. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob das Modell „systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ auf Risikopatienten nach Herzchirurgie übertragen werden kann. Außerdem sollte untersucht werden, ob ein standardisiertes Immunmonitoring in der Lage ist, bei diesen Patienten Infektionen frühzeitig vor klinischer Manifestation vorherzusagen, und ob diese neuen Immunparameter konventionellen Routine-Infektionsmarkern (SIRS-Kriterien, CRP) in ihrer diskriminativen Aussagekraft überlegen sind. Die Ergebnisse zeigen, dass das Modell an diesem Patientenkollektiv bestätigt werden kann. Die Immunaktivierungsmarker total-IL-8 (nach Erythrozytenlyse), PCT und ex vivo Elastase, sowie das antiinflammatorische IL-10 im Plasma und der Immunkompetenzmarker HLA-DR auf Monozyten zeigten am 1. postoperativen Tag ein hohes diskriminatives Potential, Infektionen im 6-tägigen postoperativen Verlauf vorherzusagen. Analysen der ROC-Kurven ergaben für HLA-DR eine AUC von 0,75, die AUC von total-IL-8 betrug 0,73, ex vivo Elastase erreichte 0,72, und PCT und IL-10 kamen jeweils auf 0,68. Dagegen konnten konventionelle Infektionsmarker nicht signifikant zwischen Patienten mit versus ohne postoperativer Infektion unterscheiden (CRP), beziehungsweise errechnete sich für 2 positive SIRS-Kriterien eine AUC von nur 0,66. Durch die bei einem solchen Patientenkollektiv erstmalige Verwendung hochstandardisierter Messverfahren (exakte Quantifizierung von Oberflächenmolekülen, semi-automatisches ELISA-System) wurde neben einer besseren Quantifizierung der gestörten Homöostase zwischen Inflammation und Antiinflammation eine wichtige Voraussetzung für die klinische Etablierung dieser neuen Marker geschaffen. Auf dieser Basis lassen sich früh identifizierte Risikopatienten adjuvanten Therapieversuchen zuführen.

Schlagworte: Immunmonitoring, Herzchirurgie, Prädiktion von Infektion, SIRS, CARS, Sepsis, HLA-DR, IL-8, PCT, ex vivo Elastase, IL-10

## Abstract

Basically, cardiac surgery involving cardiopulmonary bypass leads to systemic inflammation (SIRS) by the secretion of proinflammatory mediators. In order to limit its extend, systemic inflammation is associated with systemic counter-regulation (CARS), which, under some circumstances, may lead to high susceptibility of the organism to secondary infections. Septic disease is among the most common causes of death in surgical ICUs, the costs are estimated at several billion Euros per year. The early diagnosis in particular is of great importance clinically. Understanding of the immunologic principles is a basic assumption with regard to finding new markers of infection. This study was performed to determine whether the model “systemic immune activation – counter-regulation and immune depression – high susceptibility to infections” could be transferred to risk patients after cardiac surgery. In addition, a standardized immune monitoring program should be examined regarding its ability to predict infection in this patient population before clinical manifestation. It should also be determined if these new parameters have more discriminative power than conventional routine markers of infection (SIRS, CRP). The results show that this model can be confirmed in this patient collective. On the 1st postoperative day markers of immune activation, total-IL-8 (after lysis of erythrocytes), PCT and ex vivo elastase, as well as anti-inflammatory IL-10 in plasma and the marker of immune competence, HLA-DR on monocytes, have high discriminative potential to predict infections during the 6-day postoperative course. AUCs of the ROC were 0.75 for HLA-DR, 0.73 for total-IL-8, 0.72 for ex vivo elastase, 0.68 for both PCT and IL-10. On the other hand, conventional markers of infection were not able to discriminate significantly between patients with infection versus those without (CRP), or they only had an AUC of 0.66 (for 2 positive SIRS criteria). By using well-standardised laboratory methods (exact quantification of surface molecules, semi-automatic ELISA-system), which were used for the first time in such a patient collective, an important basis for clinical establishing these new markers was created, in addition to a better quantification of the immunologic unbalance (inflammation versus anti-inflammation). Thus, it is possible to supply early identified risk patients for adjuvant therapy trials.

Key words: immune monitoring, cardiac surgery, prediction of infection, SIRS, CARS, Sepsis, HLA-DR, IL-8, PCT, ex vivo elastase, IL-10

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis .....	3
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>1 GRUNDLAGEN .....</b>	<b>8</b>
Einleitung .....	8
Homöostase von Inflammation und Antiinflammation .....	9
<b>1.1 SIRS – CARS – MARS .....</b>	<b>9</b>
Systemische Entzündung und Sepsis.....	10
Systemische Antiinflammation.....	12
Immundepression .....	13
<b>1.2 KLINISCHE DEFINITIONEN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 HERZLUNGENMASCHINE ALS INITIATOR EINES SIRS .....</b>	<b>17</b>
Funktionsprinzip der Herzlungenmaschine .....	18
Herzlungenmaschine und SIRS .....	18
<b>2 PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 ARBEITSMATERIALIEN.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 PATIENTEN .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 LABORBESTIMMUNGEN UND KLINISCHE DATENERHEBUNG.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON OBERFLÄCHENPROTEINEN .....</b>	<b>27</b>
Grundlagen .....	27
Durchführung .....	28
Analyse und Auswertung .....	28
<b>3.5 KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN HUMORALER MARKER MITTELS ELISA .....</b>	<b>31</b>
Grundprinzip des ELISA anhand der <i>ex vivo</i> Elastase-Bestimmungen und Erweiterung des Elastase-	
Messprotokolls .....	31
Bestimmung von IL-6, total-IL-8, Plasma-IL-10, LBP, CRP und PCT .....	32
Monozytäre <i>ex vivo</i> TNF- $\alpha$ Sekretionskapazität .....	33
<b>3.6 BESTIMMUNG DER LEUKOZYTÄREN mRNA-EXPRESSION MITTELS RT-PCR.....</b>	<b>33</b>
3.6.1 Leukozytenpräparation.....	33
3.6.2 RNA-Präparation und Quantifizierung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer .....	34
3.6.3 Reverse Transkription mit dem „First Strand cDNA-Synthesis Kit“ .....	34
3.6.4 TaqMan® Real Time Reverse Transkriptase (RT) Polymerase-Kettenreaktion .....	35
Grundlagen .....	35
Durchführung .....	37
3.6.5 Etablierung eines Panels.....	40

3.7	EXPLORATORISCHE ANALYSE (DESKRIPTIVE STATISTIK) UND INTERFERENZ-STATISTIK (KONFIRMATORISCHE ANALYSE).....	41
4	ERGEBNISSE .....	42
4.1	KLINISCHE UND PARAKLINISCHE EINTEILUNG DER PATIENTEN.....	42
4.2	WERTE DER GEMESSENEN PARAMETER.....	44
4.3	UNTERSUCHUNG DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS BEZÜGLICH IMMUNAKTIVIERUNG / IMMUNDEAKTIVIERUNG .....	47
4.3.1	Erhöhung von Immunaktivierungsmarkern in allen Patientengruppen .....	47
4.3.2	Immundeaktivierung / Immundepression in allen Patientengruppen .....	50
4.4	PARAKLINISCHE PATIENTENGRUPPEN: IMMUNAKTIVIERUNG UND HLA-DR-ERHOLUNG .....	53
4.5	DIFFERENZIERTE UNTERSUCHUNG DER VERSCHIEDENEN KLINISCHEN PATIENTENGRUPPEN .....	56
4.5.1	Immunaktivierung bei Patienten mit postoperativer Infektion .....	56
4.5.2	Immundeaktivierung bei Patienten mit postoperativer Infektion .....	58
4.6	ROC-ANALYSEN .....	58
4.6.1	Marker bezüglich postoperativer Infektion (Gruppe B und C) .....	58
4.6.2	Marker bezüglich bestätigter postoperativer Infektion (Gruppe C).....	62
4.6.3	Marker am Tag 1 bezüglich Infektion <i>ab Tag 2</i> (Gruppe B und C) .....	62
5	DISKUSSION.....	65
5.1	UNTERSUCHUNG DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS .....	66
5.1.1	Systemische Immunaktivierung des gesamten Patientenkollektivs.....	66
5.1.2	Immundepression des gesamten Patientenkollektivs .....	68
5.2	FRÜHE IMMUNAKTIVIERUNG AM TAG 1 UND PERSISTIERENDE IMMUNDEPRESSION .....	69
5.3	UNTERSUCHUNG DER KLINISCHEN PATIENTENGRUPPEN .....	70
5.3.1	Erhöhte systemische Immunaktivierung bei Patienten mit postoperativer Infektion .....	70
5.3.2	Ausgeprägte Immundepression bei Patienten mit postoperativer Infektion.....	72
5.4	BESTÄTIGUNG DES IMMUNOLOGISCHEN MODELLS .....	73
5.5	IMMUNMARKER FÜR DIE PRÄDIKTION VON POSTOPERATIVER INFEKTION.....	75
5.6	KLINISCHE RELEVANZ.....	78
5.7	EINSCHRÄNKENDE ASPEKTE DER AUSWERTUNGEN .....	80
5.8	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	81
	REFERENZEN.....	82
	ANHANG .....	I
	Danksagung.....	I
	Publikationen und Präsentationen .....	II
	Eidesstattliche Erklärung.....	III

## Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATS	American Thoracic Society
AUC	Area under the Curve (Fläche unter der Kurve)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CCM	Charité Campus Mitte
CD	Cluster of Differentiation ( <i>Nomenklatur für Oberflächenmoleküle</i> )
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
CO	Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
C <sub>T</sub>	Threshold Cycle
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethyl-Pyrocarbonat-Wasser
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FACS <sup>TM</sup>	Fluorescence Activated Cell Sorting
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leucocyte Antigen
HLM	Herzlungenmaschine
HO-1	Hämoxigenase-1
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HWZ	Halbwertszeit
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
ITS	Intensivstation
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumbikarbonat
LBP	LPS binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome
MBP	Mannose binding Protein
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome

MOV	Multiorganversagen
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NF	Nuklear Factor
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
NPV	negativ prädiktiver Wert
NTC	No Template Controls
NTP	Nukleotidtriphosphat
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphat buffered Solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Procalcitonin
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	polymorphnukleär
PMT	Photomultiplier
PPV	positiv prädiktiver Wert
RA	Rezeptor-Antagonist
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristics
RR	Relatives Risiko
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SIS	Surgical Infection Society
SOCS-3	Suppressor of Cytokine Signaling-3
SSC	Side Scatter
sTNF- $\alpha$ -R	soluble TNF- $\alpha$ Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll Like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UNG	Uracil-N-Glycosylase
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Aufrechterhaltung einer Homöostase zwischen Inflammation und Antiinflammation ist für den menschlichen Organismus von großer Bedeutung. Der Einsatz der Herzlungenmaschine in der Herzchirurgie führt durch die Induktion der Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren im allgemeinen zu einer systemischen Entzündung (SIRS). Damit einhergehend kommt es zur Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren, die zusammen mit dem operativen Stress eine systemische Antiinflammation (CARS) induzieren. Das Gleichgewicht zwischen Inflammation und Antiinflammation kann derart gestört werden, dass letztere überwiegt und den Patienten anfällig macht für sekundäre Infektionen, die die Kosten erhöhen und zur Sepsis führen können. Septische Krankheitsbilder zählen zu den häufigsten Todesursachen auf nicht-kardiologischen Intensivstationen mit jährlichen Kosten in Milliardenhöhe. Für die klinische Prophylaxe und die rechtzeitige Einleitung der Therapie ist gerade die Früherkennung von größter Wichtigkeit. Bei der Suche nach neuen, potenten Infektionsmarkern ist das Verständnis der immunologischen Grundlagen von großer Bedeutung.

In einer prospektiven Kohortenstudie von Risikopatienten (Alter >70 Jahre und/oder linksventrikuläre Ejektionsfraktion <25 %) nach Herzchirurgie sollte untersucht werden, ob

1. das Modell „systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ an diesem Patientenkollektiv bestätigt werden kann,
2. es Marker gibt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit postoperative infektiöse Komplikationen bei diesen Patienten frühzeitig vorhersagen können,
3. diese Marker ein höheres diskriminatives Potenzial hinsichtlich der Entwicklung postoperativer infektiöser Komplikationen besitzen als konventionelle Routine-Marker wie SIRS oder CRP.

Die Patienten wurden vom 1. bis zum 3., wenn möglich bis zum 6. postoperativen Tag beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Patienten postoperativ eine systemische Aktivierung des Immunsystems aufwiesen, die sich in der Erhöhung von total-IL-8 (nach Lyse der Erythrozyten), LBP, CRP und IL-6 im Plasma, sowie in einer vermehrten Neutrophilenaktivierung (*ex vivo* Elastase-Sekretion und neutrophile CD64-Expression) niederschlug. Eine Erniedrigung der leukozytären mRNA-Expression von Rantes und IL-8 deutet an, dass die Blutleukozyten nicht



die (alleinigen) Produzenten für die proinflammatorischen Faktoren sind. Als Zeichen ausgeprägter Immundeaktivierung und –depression zeigten die Patienten eine allgemein erniedrigte Expression von monozytärem HLA-DR und CD86, ebenso wie eine Erniedrigung der *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion. Außerdem wiesen die Patienten erhöhte Plasma-IL-10-Spiegel und eine erhöhte leukozytäre mRNA-Expression von IL-10 und SOCS-3 auf.

Korrelationsanalysen und nonparametrische Varianzanalysen bestätigten den Zusammenhang zwischen hohen Werten in den Immunaktivierungsmarkern am Tag 1 postoperativ und niedrigerer monozytärer HLA-DR-Expression im 6-tägigen postoperativen Verlauf.

Patienten, die im postoperativen Verlauf Infektionen entwickelten, wiesen signifikant höhere Spiegel vor allem an total-IL-8 und PCT auf und zeigten eine höhere *ex vivo* Elastase-Produktion und eine höhere neutrophile CD64-Expression. Dementsprechend waren bei diesen Patienten die monozytäre HLA-DR-Expression und die *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion stark erniedrigt, bei erhöhten IL-10-Plasma-Spiegeln. Insofern kann das Modell „systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ an diesem Patientenkollektiv als bestätigt angesehen werden. ROC-Analysen von diesen Markern am Tag 1 ergaben ein deutlich höheres diskriminatives Potenzial für die Prädiktion von postoperativer Infektion im Vergleich zum CRP und zu SIRS-Kriterien. Monozytäres HLA-DR am Tag 1 erreichte eine AUC von 0,75, total-IL-8 kam auf 0,73, *ex vivo* Elastase erreichte 0,72, PCT und Plasma-IL-10 erreichten jeweils 0,68. Dagegen konnte CRP am Tag 1 nicht signifikant zwischen Patienten mit versus ohne Infektion im postoperativen Verlauf unterscheiden, mindestens 2 positive SIRS-Kriterien erreichten eine AUC von nur 0,66. Für die Prädiktion von mikrobiologisch bestätigter Infektion (unter Ausschluss der Patienten lediglich mit klinischem Verdacht auf Infektion) betrug die AUC für monozytäres HLA-DR 0,85, für PCT 0,77, für total-IL-8 und Plasma-IL-10 jeweils 0,76. Für die Prädiktion von Infektion mindestens 24 Stunden vor ihrer klinischen Manifestation (Tag 1-Werte der Marker bezüglich Infektion ab Tag 2, unter Ausschluss derjenigen Patienten mit einer Infektion am Tag 1) erreichte das monozytäre HLA-DR eine AUC von 0,72 und *ex vivo* Elastase 0,68.

Diese Ergebnisse belegen das hohe diskriminative Potenzial einiger gemessener Parameter. Vor allem das monozytäre HLA-DR ist den konventionellen Infektionsmarkern eindeutig überlegen. Somit stellen die Ergebnisse einen wichtigen Beitrag bei der Suche nach neuen, potenten Infektions- / Sepsismarkern dar.

Die Verwendung hochstandardisierter Messverfahren (Quantibrite™-Standard-Beads für die Bestimmung der Oberflächenmoleküle und die Verwendung des semi-automatischen IMMULITE®-Systems für einige der untersuchten löslichen Faktoren) macht eine bessere

Quantifizierung der Störung der Homöostase zwischen Inflammation und Antiinflammation möglich und erfüllt eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung dieser neuen Marker in der Klinik. Damit ist eine wichtige Basis für gezielte Interventionsstudien an auf diese Weise identifizierten Risikopatienten geschaffen.

# 1 GRUNDLAGEN

## Einleitung

Grundsätzlich ist im menschlichen Organismus die Aufrechterhaltung von Homöostase in zahlreichen physiologischen Systemen von fundamentaler Bedeutung. Ein Ungleichgewicht zwischen den beteiligten Komponenten kann zu pathologischen Zuständen führen, die den Organismus gefährden und unter Umständen vital bedrohen können, indem wichtige physiologische Funktionen nicht mehr erfüllt werden können.

So muss beispielsweise durch die Regulation des Blutdruckes (unter anderem über Barorezeptor-Reflexe unter Einbeziehung des autonomen Nervensystems) gewährleistet werden, dass unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen der Kreislauf weder stark hypoton wird, was beispielsweise zu orthostatischen Problemen oder gar Organ-Ischämien führen würde, noch dass es zu hypertensiven Entgleisungen kommt, was im Extremfall fatale Konsequenzen (zum Beispiel intrazerebrale Blutungen) haben kann. Das Gerinnungssystem unterliegt durch Aktivierung / Deaktivierung spezieller Faktoren einer äußerst sensiblen Regulation, die unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen notwendiger Koagulation und ebenso notwendiger Antikoagulation, sowie zwischen Fibrinolyse und Antifibrinolyse sicherstellt. Gerät dieses Gleichgewicht ins Wanken, kann zum einen eine übermäßige Blutungsneigung, zum anderen eine übermäßige Gerinnung folgen, wobei beide Zustände fatale Konsequenzen haben können. Weitere Beispiele sind der Säure-Basen-Haushalt, der durch Puffersysteme des Blutes, durch die Atmung und die Nierenfunktion in engen Grenzen konstant gehalten werden muss, und der Hormonhaushalt, der in vielen Fällen einer sekretionshemmenden Feedback-Kontrolle (Kontrolle durch negative Rückkopplung) unterliegt; die Liste ließe sich beliebig fortsetzen.

Nichtsdestotrotz kann das Umschlagen solcher Gleichgewichte auf die eine oder andere Seite vorübergehend physiologisch „gewünscht“, also notwendig sein, um die Körperfunktionen notwendigerweise an bestimmte Umwelt- oder pathologische Bedingungen temporär anzupassen (zum Beispiel Blutdruck-Steigerung unter körperlicher Aktivität, Überwiegen der lokalen prokoagulatorischen Aktivität bei Blutungen, und andere), allerdings zeichnen sich solche Zustände in aller Regel dadurch aus, dass sie zeitlich und / oder lokal begrenzt bleiben, so dass das Gleichgewicht zwischen den Komponenten des Systems, die Homöostase, bald wieder hergestellt ist.

## **Homöostase von Inflammation und Antiinflammation**

Das Phänomen der physiologisch notwendigen Aufrechterhaltung einer Homöostase lässt sich nach heutigem Stand der Wissenschaft in ähnlicher Weise auf das „Wechselspiel“ zwischen Entzündung (Inflammation) und Entzündungshemmung beziehungsweise Entzündungs-Gegenregulation (Antiinflammation) übertragen [1].

Auf unterschiedliche schädigende Reize (chemische, physikalische Noxen, Eindringen von mikrobiellen Erregern, Gewebsnekrosen, endogene Noxen) reagiert der menschliche Organismus mit einer gewünschten, physiologischen Entzündungs-Antwort, um das Ausmaß lokal zu begrenzen und Schaden für den gesamten Organismus abzuwenden [2,3]. Erreicht der Entzündungsprozess systemisches Niveau, so spricht man vom „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) [4,5], einer allgemeinen systemischen Entzündung, die den Blutkreislauf erreicht hat und sich klinisch in allgemeinen Krankheitszeichen (Fieber, Krankheitsgefühl) und paraklinischen Befunden (zum Beispiel Erhöhung von Leukozyten im Blut und C-reaktivem Protein (CRP)) niederschlägt. Dieses Stadium der Entzündung besitzt per se Krankheitswert und kann zu irreversiblen Organschäden führen [1,6,7].

Begleitet wird dieses Syndrom von einer Gegenregulation, die eine überschießende Entzündung verhindern soll: „Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome“ (CARS) [1,7]. Durch die physiologisch sinnvolle Entzündungshemmung wird jedoch gleichfalls die Fähigkeit des Organismus eingeschränkt, Krankheitserreger abzuwehren und Gewebe zu reparieren. Im Zustand der Homöostase befinden sich diese beiden Gegenspieler im Gleichgewicht, ein Überwiegen der einen oder anderen Seite führt unter Umständen zu lebensbedrohlichem Schock oder zu ungehinderter Ausbreitung bereits vorhandener oder neu aufgetretener opportunistischer Erreger [1,7,8].

Insofern ist auch in bezug auf Entzündung / Anti-Entzündung ein ausgewogenes Gleichgewicht, eine Homöostase, von fundamentaler Bedeutung, was in den folgenden Ausführungen verdeutlicht und konkretisiert werden soll.

### **1.1 SIRS – CARS – MARS**

Die Prozesse im Rahmen einer systemischen Immunreaktion zeichnen sich durch das komplexe Zusammenwirken einer Vielzahl von löslichen Mediatoren, intrazellulären Faktoren und membran-gebundenen Molekülen aus, deren Verständnis für Diagnostik und Therapie von kritisch Kranken, vor allem nach größeren operativen Eingriffen, entscheidend ist.

## Systemische Entzündung und Sepsis

Eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers, SIRS, kann durch zahlreiche Stimuli verursacht werden. Dazu zählen neben lokal nicht zu beherrschenden Infektionen auch nicht-infektiöse Ursachen wie schwere Traumata, große Operationen, Strahlenschäden, Verbrennungs-Verletzungen, sterile Pankreatitis und der Einsatz der Herzlungenmaschine (HLM) (siehe Kapitel 1.3), worauf der Körper mit der Initiierung einer Entzündungskaskade im Rahmen der angeborenen, unspezifischen Immunität reagiert [2,4,5]. Die systemische Entzündungsantwort auf eine Infektion wird als Sepsis bezeichnet und entspricht im Endstadium (Septischer Schock / Multiorganversagen (MOV)) der schwersten Form einer Infektion [6].

Sepsis und Septischer Schock zählen heutzutage zu den häufigsten Todesursachen auf nicht-kardiologischen Intensivstationen; die medizinischen Fortschritte bei der Behandlung von früher nicht behandelbaren Erkrankungen und speziell die Intensivmedizin führen zu zunehmender Inzidenz und Prävalenz dieser Krankheitsbilder. Allerdings sind diese laut der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. entgegen ihrer beträchtlichen klinischen Relevanz und gesundheitsökonomischen Bedeutung in den medizinischen Fachgesellschaften nicht adäquat repräsentiert [9]. In Nordamerika beträgt die jährliche Inzidenz für Schwere Sepsis circa 300/100.000 Einwohner und liegt damit höher als die Inzidenzen für Darm- oder Brustkrebs [10]. Die Mortalität ist vergleichbar mit der durch akuten Herzinfarkt, in den USA circa 200.000 pro Jahr. In Deutschland werden die Kosten für septische Krankheitsbilder auf mehrere Milliarden Euro pro Jahr geschätzt, mit durchschnittlichen Behandlungskosten von über 20.000 Euro pro Patient [11].

Bei einer Sepsis kommt es durch Bestandteile aus der Wand gram-negativer Bakterien (Lipopolysaccharide (LPS) = Endotoxin) beziehungsweise gram-positiver Bakterien (Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren) oder auch durch Pilzstrukturen zur Aktivierung von Immunzellen (Monozyten / Makrophagen, Lymphozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen, neutrophile Granulozyten) und Endothelzellen, sowie vom Gerinnungs- und Komplementsystem [12].

Am besten untersucht ist die Reaktion des Immunsystems auf bakterielle Endotoxine, die im Blut an das von Hepatozyten gebildete LPS binding Protein (LBP) binden, und als LPS-LBP-Komplex an das auf der Oberflächenmembran von Monozyten / Makrophagen gelegene und als Komplex mit dem Toll Like Receptor (TLR)-4 vorliegende Oberflächenmolekül Cluster of Differentiation<sup>1</sup> (CD) 14 (sogenannter „Pattern Recognition Receptor“) andocken [12]. Dies

---

<sup>1</sup> Nomenklatur für Oberflächenmoleküle

führt zu einer Aktivierung der Monozyten / Makrophagen über eine intrazelluläre Signalkaskade, an deren Ende über eine Aktivierung des Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B die Expression und Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$  und IL-6 steht, jene Zytokine, die als zentrale Mediatoren der proinflammatorischen Antwort bis hin zum Septischen Schock gelten. Sie sind an der Entwicklung allgemeiner Krankheitssymptome wie Fieber und Schwächegefühl beteiligt und induzieren die Bildung von Akut-Phase-Proteinen (zum Beispiel CRP, Fibrinogen, LBP, Mannose binding Protein (MBP)) in der Leber. Akut-Phase-Proteine werden unter anderem infolge großer Traumata, Verbrennungsverletzungen und systemischer Entzündungsreaktionen gebildet und sind maßgeblich an der Erhöhung der Erythrozyten-Sedimentationsrate (Blut-Senkungsgeschwindigkeit (BSG)) beteiligt. Im Falle des CRP wird durch Opsonierung die Phagozytose begünstigt [2,12,13].

Weitere wichtige Substanzen, die im Rahmen einer proinflammatorischen Antwort von aktivierten Monozyten / Makrophagen gebildet werden, sind unter anderem Substanzen mit Wirkung auf den Tonus glatter Gefäßmuskulatur (zum Beispiel Eikosanoide, NO), Stoffe mit dem Potenzial Zellen abzutöten (zum Beispiel reaktive O<sub>2</sub>-Radikale), Substanzen, die das Gerinnungssystem aktivieren (zum Beispiel Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)), und zahlreiche weitere Mediatoren. Aktivierte Endothelzellen produzieren neben IL-1 $\beta$  und IL-6 chemotaktische Zytokine wie zum Beispiel IL-8, welches über die Entstehung eines Konzentrationsgradienten zwischen Infektionsherd und Peripherie Entzündungszellen „anzulocken“ vermag („Homing“ von zum Beispiel neutrophilen Granulozyten), und ebenfalls NO [2,7,12]. Aktivierte neutrophile Granulozyten produzieren ebenfalls eine Vielzahl chemotaktisch und zytotoxisch wirkender Substanzen entsprechend ihrer Funktion als Phagozyten, sowie Proteasen (zum Beispiel Elastase), die dazu dienen, Reste abgestorbener Zellen zu zersetzen [2,14,15]. Außerdem lassen sich zahlreiche Veränderungen in der Dichte bestimmter Oberflächen-Proteine von Immunzellen nachweisen, so zum Beispiel von CD11b (Bindung dieses Integrins an seinen auf aktivierten Endothelzellen exprimierten Liganden Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 führt zum „Homing“ (und damit zur Akkumulation) im Entzündungsherd) [16,17,18,19,20,21,22], CD64 (Fc $\gamma$ R-I, derjenige mit der höchsten Affinität zum Immunglobulin (Ig) G unter den drei wichtigsten Fc $\gamma$ -Rezeptoren) [22,23,24,25,26], und andere.

Diese Immunprozesse können als systemische inflammatorische Antwort auf eine Infektion (Sepsis) zu Organdysfunktion bis hin zum MOV führen (Schwere Sepsis und Septischer Schock, siehe Kapitel 1.2) [4,5].

In der Tat gibt es Belege für eine Progression vom sterilen SIRS über Sepsis, Schwere Sepsis bis zum Septischen Schock, sowohl klinisch als auch auf Zytokinebene (siehe Kapitel 1.2) [27,28]. Große Probleme bei der Behandlung von Patienten im Septischen Schock bereitet das Versagen einzelner oder auch mehrerer Organsysteme, was häufig in einen letalen Ausgang mündet. Die Mechanismen, die zum Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) / MOV führen, waren lange Zeit unklar, beziehungsweise sind auch heute noch nicht komplett verstanden. Man kann mit einiger Sicherheit Organschäden auf direkte Wirkungen einiger genannter Zytokine zurückführen, sowie auf O<sub>2</sub>-Mangelzustände infolge Hypoperfusion und durch kleinste Fibrin-Gerinnsel (durch Gerinnungs-Aktivierung), O<sub>2</sub>-Mangel infolge starker Vasodilatation durch NO, auf Effekte durch PAF, Prostaglandine, Histamin, reaktive Sauerstoffradikale und Proteasen aus aktivierten Phagozyten (zum Beispiel Elastase), und andere [4,5,6,7,12]. Außerdem könnte eine Rolle spielen, dass aktivierte Granulozyten durch hohe systemische IL-8-Spiegel und den dadurch bedingten Wegfall des Konzentrationsgradienten zwischen Infektionsherd und Peripherie weniger stark zum Infektionsherd als ihrem eigentlichen „Einsatzort“ geleitet werden und auf diese Weise Schäden an anderen Organen mit verursachen. (H.D. Volk, persönliche Mitteilung). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die chemotaktische Funktion von IL-8 für Neutrophile bei Septikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant reduziert war [29].

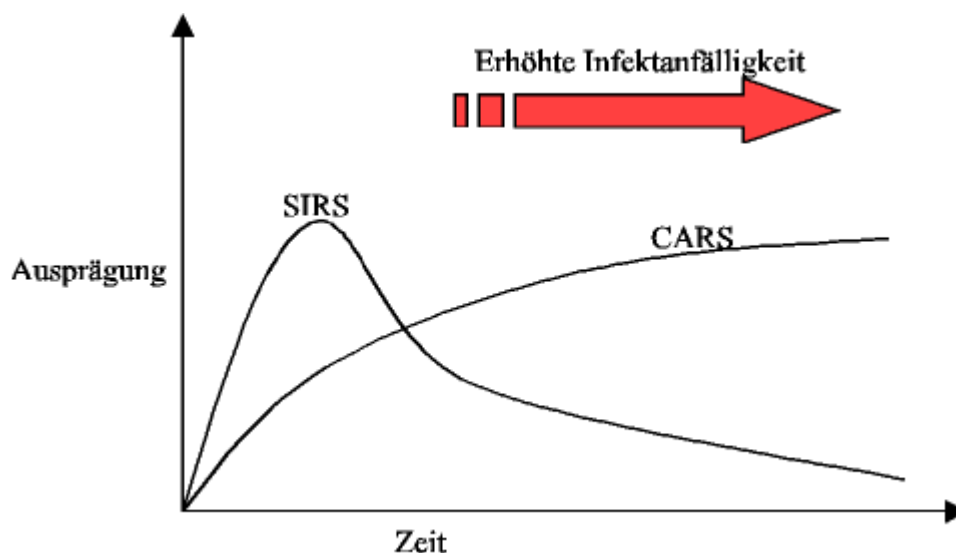
### **Systemische Antiinflammation**

Da die übermäßige systemische Entzündung mit ihren Entzündungsmediatoren ursächlich für den schlechten Verlauf septischer Patienten zu sein schien, wurden viele Hoffnungen mit der Entwicklung von Medikamenten verbunden, die die Entzündungskaskade durch Blockierung zentraler Zytokine und Bakterienbestandteile stoppen sollten, zum Beispiel mit Antikörpern gegen TNF- $\alpha$ , LPS, und andere. Fast sämtliche Studien konnten allerdings keinen positiven Effekt zeigen, manche Substanzen schienen die Letalität sogar zu erhöhen [30,31].

Grund hierfür war die aus heutiger Perspektive zu einseitige Sicht dessen, was im Rahmen einer systemischen Entzündungsantwort auf Infektion im Körper passiert. Man vernachlässigte ein weiteres Phänomen im Krankheitsverlauf einer Sepsis: die bereits erwähnte Gegenregulation einer Entzündung, die auf systemischem Niveau als systemische Antiinflammation imponiert („Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome“ (CARS)) [1,7,8,12]. Physiologischerweise dient sie dazu, einer in Gang gesetzten Entzündungskaskade entgegenzuwirken, den Organismus somit vor übermäßiger, unkontrollierter Inflammation zu schützen. Als Mediatoren fungieren dabei vor allem IL-10, löslicher TNF- $\alpha$ -Rezeptor (sTNF- $\alpha$ -

R), IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1-RA) und Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ , IL-4, Prostaglandin (PG)-E<sub>2</sub> sowie Stresshormone wie Adrenalin und Glukokortikoide [1,7,8,12,32]. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass sich die systemische Antiinflammation aus zwei Komponenten zusammensetzt: zum einen auf direkter Ebene der Entzündungszellen als Gegenregulation infolge systemischer Entzündung, und zum anderen indirekt durch die Induktion und Wirkung von Stresshormonen / -mediatoren.

Die Immunantwort des Organismus auf eine schwere Infektion wird somit als ein zweiphasiges Konzept verstanden, mit einer initialen systemischen Inflammation (SIRS), die einhergeht mit einer systemischen Antiinflammation (CARS), wobei beide Phänomene überlappend vorliegen. Mit zunehmender Zeit dominiert dann das CARS (*Abbildung 1*) [1,7,8,12]. Bone nannte dieses Nebeneinander von systemischer Inflammation und Antiinflammation „Mixed Antagonistic Response Syndrome“ (MARS) [1].



*Abbildung 1:* Nach schwerer Infektion, Trauma oder großer Operation kommt es zunächst zu einer Phase mit dominierender systemischer Immunaktivierung (SIRS), gefolgt von beziehungsweise einhergehend mit einer Phase dominierender Antiinflammation (CARS), in der der Patient einer erhöhten Infektanfälligkeit ausgesetzt ist. (In Anlehnung an Tom van der Poll, Lancet Infect Dis, 2001 [30])

## Immundepression

Man erkannte, dass bei Patienten nach ausgeprägter Immunaktivierung (SIRS) die Fähigkeit einiger Immunzellen, inflammatorisch zu reagieren, stark reduziert war. So zeigten in zahlreichen Sepsisstudien Monozyten eine stark verminderte Expression des Humanen-Leukozyten-Antigens (HLA)-DR, ein Protein, das für die Präsentation exogener Peptid-Antigene im Rahmen der erworbenen, spezifischen Immunität verantwortlich ist [3]. Eine persistierende



Reduzierung der monozytären HLA-DR-Expression führte zu einer Art immun-paralytischem Zustand. Dieser wurde zuerst an organtransplantierten Patienten beobachtet („Immunparalyse“, Volk et al. [33]), später aber auch bei intensivmedizinischen nicht-transplantierten Patienten, wo er mit signifikant schlechterem Krankheitsverlauf und höherer Anfälligkeit für septische Komplikationen einherging [8,33,34,35,36,37,38,39]. Ebenso reduziert war das Potenzial von Monozyten, nach *ex vivo* LPS-Stimulation TNF- $\alpha$  zu produzieren, eine Fähigkeit, die man für bedeutend hinsichtlich adäquater Immunreaktion auf pathogene Stimuli (zum Beispiel Mikroorganismen) im Rahmen der unspezifischen, angeborenen Immunreaktion hält [34,40,41,42,43,44].

Man nimmt heute an, dass die Imbalance zwischen Immunaktivierung und Immundepression zugunsten letzterer ursächlich beteiligt ist an der hohen Letalität septischer Krankheitsverläufe, indem wichtige Funktionen proinflammatorischer Zytokine supprimiert werden, die im Rahmen der Abwehr des zu Grunde liegenden Infektes oder neu auftretender nosokomialer Infekte wichtig sind, trotz der in den obigen Ausführungen beschriebenen schädigenden Wirkungen. Vor diesem Hintergrund erscheinen jene im vorherigen Abschnitt erwähnten Studien, in denen bei Septikern beispielsweise TNF- $\alpha$  oder LPS geblockt wurde, in einem anderen Licht. So sei auf die physiologische Bedeutung der proinflammatorischen Mediatoren in bezug auf Wundheilung hingewiesen, beziehungsweise wird bei der Reparation von Organschäden durchaus eine positive Rolle der proinflammatorischen Zytokine gesehen [7,30]. Verabreichung von Interferon (IFN)- $\gamma$ , einem potenten immunstimulierenden Zytokin, führte in einer nicht-kontrollierten nicht-randomisierten Pilot-Studie bei Sepsis-Patienten zu einer schnelleren Erholung der stark erniedrigten monozytären HLA-DR-Expression und *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion, mit deutlichen Hinweisen für eine verbesserte Erholung von der Sepsis [34].

Die Herunterregulierung von monozytärem HLA-DR und die Erniedrigung der *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion erfolgen unter anderem unter dem Einfluss von IL-10 [41,43,45,46]. Dabei wird IL-10 zum einen als direkte Gegenregulation im Rahmen inflammatorischer Reize gebildet. Zum anderen wird über die unter „inflammatorischen Bedingungen“ aktivierte Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse und über das autonome Nervensystem die IL-10-Sekretion (vor allem in der Leber) gesteigert. Interessant scheint ferner die Tatsache, dass IL-10 sowohl durch Aktivierung des sympathischen Anteils des autonomen Nervensystems unter dem Einfluss von Katecholaminen, als auch über eine Aktivierung des parasympathischen Nervensystems (Nervus vagus) verstärkt sezerniert wird [32,47,48,49,50].

## 1.2 Klinische Definitionen

Lange Zeit bereiteten unterschiedliche klinische Definitionen für das Vorliegen einer systemischen Entzündungs-Antwort auf eine Infektion Schwierigkeiten. Es gab keine eindeutigen Kriterien, wann genau man von einer „Sepsis“ sprechen konnte; klar war, dass die unkontrollierte systemische Infektion größte Probleme bereitete in der Behandlung von ITS (Intensivstations)-Patienten, sei es in Form einer primären Infektion als Ursache für die Intensivpflichtigkeit, oder in Form einer sekundären Infektionen als Komplikation bei kritisch Kranken. Aufgrund hoher Letalität, diesbezügliche Prozentangaben lagen meist im zweistelligen Bereich, und von Fortschritten im Verständnis der systemischen Immunantwort als eine Art eigenständiges Krankheitsbild, schien der Versuch angezeigt, für in der Literatur häufig verwendete Begriffe wie zum Beispiel SIRS, Sepsis, septisches Syndrom, Septikämie klare Definitionen festzulegen.

Im Jahre 1992 wurde ein Bericht der ACCP/SCCM<sup>1</sup> Consensus Conference veröffentlicht, in dem dieser Versuch unternommen wurde [4]. Die darin enthaltenen Definitionen dienten in den folgenden Jahren in zahlreichen Studien als Grundlage für Patienteneinteilungen. Demnach spricht man bei einem Patienten

- von einem „SIRS“, wenn mindestens zwei der folgenden vier typischen Symptome (möglichst für >24h) vorliegen:
  - Hyperthermie >38°C *oder* Hypothermie <36°C
  - Herzfrequenz >90 Schläge / Minute
  - Atemfrequenz >20 / Minute *oder* arterieller CO<sub>2</sub>-Partialdruck (Pa(CO<sub>2</sub>)) <32 mmHg
  - Leukozytose >12 *oder* <4 GPT / L *oder* >10 % unreife Vorläuferzellen
- von einer „Sepsis“, wenn ein SIRS als Folge einer Infektion angesehen werden kann, in Abwesenheit anderer potentieller Ursachen für die Symptome des SIRS

---

<sup>1</sup> American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine

- von „Schwerer Sepsis“ („Severe Sepsis“), wenn eine Sepsis einhergeht mit Organdysfunktion, Hypoperfusion (zum Beispiel Laktatazidose als Zeichen für O<sub>2</sub>-Mangel in peripheren Geweben, Oligurie als Zeichen beginnender Niereninsuffizienz, Verschlechterung des Mental-Status als allgemeines Zeichen für eine Hypoperfusion des ZNS (Zentrales Nervensystem)) oder Hypotension (systolischer Blutdruck <90 mmHg oder systolische Blutdruck-Reduktion >40 mmHg vom Ausgangswert) in Abwesenheit anderer Ursachen für den Blutdruck-Abfall
- und von „Septischem Schock“ („Septic Shock“) bei einer Sepsis mit arterieller Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution und Zeichen von Organdysfunktion (siehe oben).

Das Endstadium besteht in einem „Multiple Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS) mit Funktionseinschränkungen mehrerer Organsysteme (zum Beispiel Lunge, Nieren, Leber) bis hin zum Multiorganversagen (MOV), was häufig (in circa 50-60 %) in einen letalen Ausgang mündet, wobei vor allem Vorerkrankungen und zunehmendes Lebensalter für ungünstige Krankheitsverläufe prädisponieren [51,52]. Die Verwendung von Begriffen wie „Septisches Syndrom“ oder „Septikämie“ wird nicht mehr empfohlen.

Die genannten Syndrome wurden als Krankheits-Zustände zunehmender Schwere verstanden; wie oben bereits erwähnt konnte eine klinische Progression vom sterilen SIRS über Sepsis, Schwere Sepsis bis zum Septischen Schock in einer großen Studie (n=3708) gezeigt werden [27]. Bei 68 % aller auf Intensiv- und Normal-Stationen eingeschlossenen Patienten wurde die Diagnose SIRS gestellt, von den SIRS-Patienten entwickelten 26 % eine Sepsis, 18 % eine Schwere Sepsis und 4 % einen Septischen Schock. Die zunehmende Schwere korrelierte mit zunehmender Organdysfunktion und der Letalität; letztere betrug 7 % bei Patienten mit einfachem SIRS, 16 % bei den Patienten mit der Diagnose Sepsis, 20 % bei Patienten mit Schwerer Sepsis und 46 % bei Patienten im Septischen Schock. Diese Zahlen unterstreichen außerdem die klinische Relevanz dieser Krankheitsbilder.

Obwohl über die Bestimmung von SIRS-Kriterien als Determinante für das Vorhandensein systemischer Infektion mitunter gute Studienergebnisse erzielt wurden hinsichtlich der Prädiktion des weiteren Krankheitsverlaufes [53,54], blieb und bleibt dennoch das Manko der sehr unspezifischen Kriterien, die zwar hoch sensitiv sind, aber unter einer Vielzahl von pathologischen Zuständen auftreten können. Im Jahre 2001 wurde auf der

SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS<sup>1</sup> International Sepsis Definitions Conference eine Art Bilanz der vergangenen 10 Jahre, in denen auf der Grundlage oben angeführter klinischer Definitionen gearbeitet wurde, gezogen, mit dem Ziel, diese Definitionen hinsichtlich klinischer Nützlichkeit und unter dem Eindruck erfolgter Fortschritte im theoretischen Verständnis der Krankheitsbilder zu überprüfen [5]. Es wurde festgestellt, dass die Einteilung auch circa 10 Jahre nach dem Bericht der Consensus Conference prinzipiell sinnvoll sei, vor allem die Definitionen für Sepsis, Schwere Sepsis und Septischen Schock entsprächen nach wie vor der klinischen Realität. Mit Blick auf die Unspezifität der Diagnose „SIRS“ anhand der oben erwähnten Kriterien wird jedoch für die Zukunft die Notwendigkeit gesehen, zunehmend biologische Parameter anstelle der klinischen Kriterien einzusetzen, beziehungsweise wird die Entwicklung weiterer biologischer oder biochemischer Parameter als ein bedeutendes Ziel zukünftiger Studien angesehen.

### **1.3 Herzlungenmaschine als Initiator eines SIRS**

Die Herzlungenmaschine (HLM) stellt einen künstlichen Ersatz von Herz und Lunge, das heißt des kleinen Kreislafs inklusive dem linken Herz, dar, so dass die Funktionen des Herzens als Kreislauf-Pumpe und der Lunge als Organ des Gasaustausches vorübergehend ersetzt werden (extrakorporale Zirkulation), und auf diese Weise Operationen am offenen Herzen möglich werden. Zu den Indikationen des HLM-Einsatzes zählen Herzklappenoperationen, Bypassoperationen, Operationen thorakaler Aortenaneurysmen und Korrekturen angeborener Herzfehler [55].

Allerdings stellt der Einsatz der HLM, zumal in Kombination mit einer Operation größeren Ausmaßes (Herzoperation), für den Patienten eine außergewöhnliche, man möchte fast sagen einzigartige Situation dar: vorübergehend wird der Kreislauf durch eine kontinuierliche, gleichmäßige Pumpleistung (im Unterschied zur physiologischen pulsatilen Pumpweise des Herzens) aufrecht erhalten, und die Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff sowie die Wärmeregulation mit der im Rahmen der Operation notwendigen Erzeugung von Hypothermie werden außerhalb des Körpers vorgenommen, in den „künstlichen Gefäßen“ der HLM, durch die das gesamte Blutvolumen des Organismus geleitet wird. Dieser Zustand weicht stark von der physiologischen Situation ab. Ausgehend von der grundsätzlichen Annahme, dass in der Medizin möglichst physiologische Zustände für den Körper am günstigsten sind, beziehungsweise

---

<sup>1</sup> Society of Critical Care Medicine / European Society of Intensive Care Medicine / American College of Chest Physicians / American Thoracic Society / Surgical Infection Society

extreme nicht-physiologische Situationen dem Körper schaden können (zum Beispiel künstliche Beatmung versus frühzeitige Extubation, parenterale versus enterale Ernährung), erscheinen die auf den Einsatz der HLM zurückzuführenden Veränderungen (siehe unten) nicht überraschend. Dem entspricht ein Zitat von Westaby aus dem Jahre 1983 [56]: „*It would be naive to expect the body to tolerate exposure of its total blood volume to the foreign material in the bypass circuit without some sort of defence response.*”<sup>1</sup>

### **Funktionsprinzip der Herzlungenmaschine**

Hauptkomponenten der HLM sind die Blutpumpe, mit der kontinuierlich oder pulsatil die Blutzirkulation aufrechterhalten wird, der Oxygenator, der mittels einer semi-permeablen Membran eine O<sub>2</sub>-Aufnahme bei gleichzeitiger CO<sub>2</sub>-Abgabe ermöglicht, der Wärmetauscher für das rasche Kühlen und Erwärmen des Perfusates und damit des Patienten, und schließlich der Sauger, mit dem intraoperativ aus dem Herzen abgesaugtes Blut der HLM und damit der Zirkulation zurückgeführt wird [55].

Für den Anschluss des Kreislaufs an die HLM wird über zwei Katheter, die die obere und untere Vena cava drainieren, das venöse Blut zur HLM geleitet, wo es durch den Wärmetauscher gekühlt und im Oxygenator unter CO<sub>2</sub>-Abgabe mit Sauerstoff angereichert wird. Über einen in der Aorta ascendens platzierten Katheter wird das Blut zurück in den Kreislauf geführt. Durch die Kühlung des Blutes erreicht man neben der Reduzierung von Stoffwechselvorgängen im Körper (weniger Sauerstoffverbrauch und weniger Anfall schädigender saurer Metabolite) eine Abkühlung des Herzens mit der Folge des Auftretens von Kammerflimmern. Zusätzlich wird durch die Perfusion der Koronararterien mit einer kaliumreichen Lösung über einen selektiv eingebrachten Katheter eine elektromechanische Entkoppelung provoziert. Auf diese Weise wird das Herz in einen kardioplegischen Zustand versetzt, als Voraussetzung für die Operation am offenen Herzen [55].

### **Herzlungenmaschine und SIRS**

Eine Reihe von Faktoren, die mittelbar oder unmittelbar durch den Einsatz der HLM bedingt sind, führen grundsätzlich zu einer systemischen Immunaktivierung [57,58,59]. Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen dabei der Kontakt des Blutes mit den körperfremden Oberflächen des HLM-Apparates (Aktivierung von Inflammation und Gerinnung) und Ischämie-

---

<sup>1</sup> „Es wäre naiv zu erwarten, dass der Körper den Kontakt seines gesamten Blutvolumens mit dem fremden Material des Herzlungenmaschinen-Apparates ohne eine Art von Abwehrreaktion toleriert.“

Reperfusionsschäden infolge der Umstellung der extrakorporalen auf die physiologische Zirkulation am Ende der Operation (Bildung von O<sub>2</sub>-Radikalen, Lipid-Peroxidation). Außerdem gibt es zahlreiche Hinweise für eine Translokation von Endotoxin durch die Darmmukosa ins Blut, bedingt durch ischämische Zustände im Splanchnikus-Gebiet während der extrakorporalen Zirkulation [57,58,59,60,61,62].

Äquivalent zu den Ausführungen über systemische Inflammation (siehe Kapitel 1.1) kommt es zur Sekretion einer Reihe von Zytokinen, darunter TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und IL-8. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt zur Produktion von reaktiven O<sub>2</sub>-Radikalen [63] und Elastase [64], sowie zur verstärkten Expression zum Beispiel von CD11b [61]. Aktivierte Endothelzellen exprimieren verstärkt Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel ICAM-1, außerdem wird durch die „inducible Nitric Oxide Synthase“ (iNOS) die Produktion von NO verstärkt [65]. Auswirkungen auf das zelluläre Immunsystem schlagen sich in einem Anstieg der CD8-positiven und einer Verminderung der CD4-positiven T-Zellen, vor allem der TH1-Zellen [58], nieder. Eine Gegenregulation der Entzündung findet unter anderem über sTNF- $\alpha$ -R, IL-1-RA und IL-10 statt [57,62].

Studien, die einen Vergleich zwischen konventionellen Herzoperationen (mit HLM-Einsatz) und Herzoperationen ohne Einsatz der HLM („Operation am schlagenden Herzen“) zum Gegenstand hatten, ergaben eine signifikant stärkere Expression von Immunaktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen bei Patienten nach konventionellen Herzoperationen [66,67,68,69], *ex vivo* Untersuchungen an isolierten HLM-Einheiten mit Spenderblut ergaben ebenfalls eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine [61]. Dadurch wird die bedeutende Rolle der HLM bei der Induktion einer systemischen Entzündung als zusätzlicher Trigger neben dem operativen Eingriff unterstrichen.

Die HLM stellt für die Patienten einen großen Risikofaktor dar und wird für den oft komplikationsträchtigen postoperativen Verlauf (Organdysfunktionen, SIRS) mit verantwortlich gemacht [63,65]. Die Häufigkeit von Schwerer Sepsis nach HLM-OP liegt bei etwa 2 % (so in einer großen prospektiven Studie [70]), wobei insbesondere Patienten mit diversen Vorerkrankungen wie stark reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, eingeschränkter Nierenfunktion oder Lungenerkrankungen, sowie Patienten höheren Alters einen stärker komplikationsträchtigen Verlauf mit höherer postoperativer Morbidität und Letalität zeigen [70,71,72,73]. Während das Risiko für postoperative Infektionen insgesamt mit einigen Prozent eher gering ist, steigt es mit zunehmender Anzahl an Risikofaktoren und zunehmendem Alter auf zweistellige Prozentwerte.

## 2 PROBLEMSTELLUNG

Von großer Bedeutung für den Kliniker in der perioperativen Behandlung von Patienten ist das möglichst frühzeitige Erkennen infektiöser Komplikationen, um rechtzeitig und gezielt zum Beispiel durch das Einleiten einer antibiotischen Therapie intervenieren zu können. In der klinischen Praxis dienen neben allgemeinen Symptomen für eine Infektion (Fieber, Reduzierung des Allgemeinzustandes) vor allem die Bestimmung des Blutbildes (Leukozytenzahl) und das CRP als diagnostische Standardparameter. Das CRP als Marker für neu aufgetretene Entzündungsreaktionen und deren Verlaufskontrolle ist aus dem klinischen Alltag derzeit nicht wegzudenken. Allerdings sind diese Entzündungszeichen und –marker für die Diskriminierung von SIRS versus Sepsis und von fortgeschrittenen Sepsis-Stadien (Schwere Sepsis, Septischer Schock) ungeeignet; insgesamt zeichnen sie sich durch sehr geringe Spezifität und zum Teil mangelnde Sensitivität vor allem in den Frühstadien einer Infektion aus [74,75,76]. Insofern muss die Frage, ob es *den* Marker gibt, der in der Lage ist, schwerwiegende infektiöse Komplikationen möglichst noch vor deren klinischer Manifestation vorherzusagen, derzeit mit einem klaren Nein beantwortet werden.

Somit darf man folgern, dass es einen großen Bedarf an neuen, potenteren Markern gibt, die in der Sepsis- und Entzündungsdiagnostik den konventionellen Markern überlegen sind. Im Bericht der SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference von 2001 (siehe Kapitel 1.2) wurde in bezug auf die klinische Diagnose „SIRS“ genau diese Notwendigkeit geäußert [5].

Kenntnisse der komplexen Zusammenhänge zwischen immunologischer Aktivierung und Deaktivierung im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion können als eine wichtige Voraussetzung für das Entdecken neuer Sepsis-Marker angesehen werden. Das Verständnis dieser Zusammenhänge ermöglicht die Identifizierung beteiligter Mediatoren, die quantitativ Aufschluss über den jeweiligen „Status“ des Immunsystems (zum Beispiel Immunaktivierung – Deaktivierung – Paralyse) geben können, was für die klinische Einschätzung des Patienten bedeutsam sein kann. Bestimmte Mediatoren kommen als immunologische Marker in Betracht mit dem Potenzial septische Komplikationen vorherzusagen. Dies war und ist Gegenstand intensiver Forschung. Angesichts der klinischen Relevanz infektiöser und septischer Krankheitsbilder und ihrer großen gesundheitsökonomischen Bedeutung (siehe Kapitel 1.1) erscheint dies als gerechtfertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine prospektive Kohortenstudie unter 81 Patienten durchgeführt, die sich elektiv einem herzchirurgischen Eingriff unter Einsatz der Herzlungenmaschine unterzogen. Erhöhtes Alter (>70 Jahre) und eine stark eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion (<25 %) gelten als bedeutende Risikofaktoren (siehe Kapitel 1.3) für postoperative Komplikationen (wie zum Beispiel Infektionen) und waren Voraussetzung für den Einschluss der Patienten.

Die Patienten wurden vom 1. bis mindestens zum 3., wenn möglich bis zum 6. postoperativen Tag hinsichtlich der Entwicklung postoperativer infektiöser Komplikationen analysiert, und es wurden immunologische Parameter bestimmt, die unterschiedliche Aspekte des Immunstatus widerspiegeln:

- Als Marker für die Immunaktivierung dienten die Bestimmung von IL-6, total-IL-8 (nach Erythrozytenlyse), PCT, LBP und CRP im Blutplasma, sowie die Oberflächenexpressionen von CD71, CD64 und CD11b auf Monozyten und CD64 und CD11b auf neutrophilen Granulozyten. Außerdem wurde die *ex vivo* Elastase-Produktion in Vollblut ermittelt.

Auf die Rolle von IL-6, IL-8, LBP, CRP, CD64, CD11b und Elastase wurde bereits in Kapitel 1.1 eingegangen. PCT (Procalcitonin) ist das Vorläuferprotein des Hormons Kalzitinin und wird in diversen Geweben im Zuge einer systemischen Entzündung sezerniert. Als Trigger für die PCT-Freisetzung fungiert insbesondere bakterielles Endotoxin [2]. Der Transferrin-Rezeptor CD71 wird auf Makrophagen, nicht aber auf Monozyten exprimiert. Anstiege auf Monozyten weisen auf eine Differenzierung zu Prä-Makrophagen im Rahmen erhöhter systemischer Zytokin-Spiegel hin (Döcke et al., unveröffentlichte Daten). Die genannten Parameter waren und sind Gegenstand zahlreicher Studien hinsichtlich ihrer Eignung als Infektions- / Sepsis-Marker [13,14,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,28,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89].

Insbesondere das PCT zeigte zum Teil gute Ergebnisse bei der Diskriminierung zwischen sterilem SIRS und Sepsis.

- Als Marker für die systemische Gegenregulation diente die Bestimmung von IL-10 im Plasma, als Marker für eine erniedrigte Immunkompetenz wurden die monozytäre Expression von HLA-DR und von CD86 und die *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion im Vollblut gemessen.

HLA-DR, IL-10 und die *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion wurden bereits im Kapitel 1.1 besprochen. CD86 ist als kostimulatorisches Molekül (Signal 2 der Immunzell-Aktivierung) auf Antigen-



präsentierenden Zellen (APZ) der Ligand für T-lymphozytäres CD28. Es gibt Hinweise für eine bezüglich HLA-DR ähnlich-gerichtete Regulierung, so dass es als potenzieller Infektionsmarker geeignet schien [38,90]. Eine Assoziation der genannten Parameter mit dem klinischen Verlauf einer Sepsis konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden [33,35,36,37,38,44,76].

- Des weiteren wurden auf mRNA-Ebene quantitativ die leukozytären Expressionen von IL-8, Rantes und TNF- $\alpha$  (Immunaktivierung) und von IL-10, SOCS-3 und HO-1 (Immundeaktivierung) gemessen.

Rantes ist ein chemotaktisch wirksames Chemokin, das unter LPS-Einfluss exprimiert wird [91,92]. Allerdings wird bei Septikern eine geringere Expression beobachtet [93]. Hämoxygenase (HO)-1, ein Hitze-Schock-Protein, wird unter inflammatorischen und anderen Stress-Bedingungen verstärkt exprimiert. Es führt über die Bildung von Kohlenmonoxid (CO), cGMP und Biliverdin zur Hemmung der inflammatorischen Kapazität von Monozyten / Makrophagen, sowie zu Veränderungen von Endothel- und glatten Muskelzellen (Relaxation von Gefäßmuskulatur) [94,95,96,97]. Experimentelle Tierversuchsreihen zeigten in Sepsismodellen eine wichtige protektive Rolle von HO-1 [94,98,99]. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3 gilt als ein Mediator für die immunsuppressiven Effekte von IL-10 [100,101].

Durch die statistischen Auswertungen der Messergebnisse und durch Bezugsetzung der Marker zum Auftreten des Zielereignisses (Entwicklung von Infektion im postoperativen Verlauf) sollte folgenden *Fragen* nachgegangen werden:

1. Lässt sich das Modell „Systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ bei Risikopatienten nach kardiopulmonalen Eingriffen unter Einsatz der Herzlungenmaschine bestätigen?
2. Gibt es neue Marker, die mit hoher Wahrscheinlichkeit postoperative infektiöse Komplikationen bei diesen Patienten vorhersagen können?
3. Wenn ja, haben diese Marker ein höheres diskriminatives Potenzial hinsichtlich der Entwicklung postoperativer infektiöser Komplikationen als konventionelle Routine-Marker wie SIRS oder CRP?

Die Frage nach der Übertragung des theoretischen Modells auf diese Patientenpopulation dient dazu, das Verständnis der immunologischen Zusammenhänge während systemischer Entzündung zu verbessern. Dies ist grundsätzlich von Bedeutung für zukünftige theoretische Fragestellungen, sowie für die Entdeckung neuer klinischer Marker (siehe oben).

Die Ergebnisse hinsichtlich der Vorhersage von Infektion können einen Beitrag leisten zur Vervollständigung des Bildes, das man derzeit von den genannten potenziellen Markern in der Fachwelt hat. Dem Ziel der Etablierung dieser neuen Marker mit höherer Aussagekraft im Vergleich zu konventionellen SIRS-Kriterien und CRP könnte man ein Stück näher kommen.

Obwohl zahlreiche Arbeiten zum Immunmonitoring existieren, war eine breite Anwendung mangels Standardisierung bislang sehr eingeschränkt. Durch die Kalibrierung mittels Quantibrite™-Standard-Beads bei der Bestimmung der Oberflächenmoleküle und die Verwendung des semi-automatischen IMMULITE®-Systems für die Bestimmung einiger der humoralen Faktoren wurde ein sehr hohes Maß an Standardisierung erreicht (Interassay-Varianz  $cv < 8\%$  beziehungsweise  $< 6\%$  (interne Qualitätskontrolle, Institut für Medizinische Immunologie der Charité (CCM))). Erstmals in einer derartigen Studie wurde damit ein komplexes *hochstandardisiertes* Immunmonitoring-Programm für diese Fragestellung und bei einem solchen Patientenkollektiv gewählt. Damit wird eine bessere Quantifizierung des Ausmaßes, in welchem die Homöostase zwischen Inflammation und Antiinflammation bei diesen Patienten gestört ist, möglich. Zudem wird eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung dieser neuen Marker geschaffen, und eine einheitliche Angabe von Schwellenwerten wird möglich.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Arbeitsmaterialien

#### Geräte

- FACS-Calibur™-Durchflusszytometer [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- IMMULITE® [DPC Biermann; Bad Nauheim, D]
- Beri-Lux Analyzer 250 [Behring; Marburg, D]
- ELISA-Mess-System [Anthos Labtec Instruments; Salzburg, A]
- Agilent 2100 Bioanalyzer [Agilent Technologies; Waldbronn, D]
- DNA Thermo Cycler (TC 1) [Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D]
- GeneAmp 5700 Sequenz Detection System [Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D]
- Megafuge 1.0 [Heraeus Sepatech; Osterode, D]
- Kühlzentrifuge CR 422 [Jouan; Saint Nazaire, F]
- Mikrozentrifuge [Eppendorf; Hamburg, D]
- Brutschrank EG 110 R [Jouan; Saint Nazaire, F]
- Absaugpumpe Laboport [Neuberger; Freiburg, D]
- Pipetten [Eppendorf; Hamburg, D]

#### Verbrauchsmaterialien

- Blutentnahme-Monovetten [Sarstedt; Nümbrecht, D]
- Reaktionsgefäße [Eppendorf; Hamburg, D]
- [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- [Greiner, Frickenhausen, D]
- [Sarstedt; Nümbrecht, D]
- [Hirschmann; Eberstadt, D]
- [Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D]
- [Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D]

#### Biochemikalien / Reagenzien

- Anti-HLA-DR PE / Anti-CD14 PerCP-Cy5.5 - Antikörper [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- Anti-CD86 PE / Anti-CD14 PerCP-Cy5.5 - Antikörper [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- Anti-CD71 PE / Anti-CD14 PerCP-Cy5.5 - Antikörper [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- Anti-CD64 PE / Anti-CD45 PerCP - Antikörper [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- Anti-CD11b PE / Anti-CD45 PerCP - Antikörper [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- FACS®-Lysing-Solution [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- Zell-Lyse-Lösung für IL-8 [Milenia Biotec GmbH; Bad Nauheim, D]
- PBS [Hausapotheke Charité, Berlin, D]
- Aqua-dest [Braun; Melsungen, D]
- DEPC [Sigma; Steinheim, D]
- PMA [Sigma; Steinheim, D]
- RPMI 1640 Zell-Kultur-Medium [Biochrom KG; Berlin, D]
- Mercaptoethanol [Merck; Darmstadt, D]
- TaqMan®-Mastermix [Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D]
- PCR-Primer [Metabion; Planegg-Martinsried, D]
- PCR-Sonden [Eurogentec; Seraing, B]

*FACS-Puffer, Zusammensetzung:*

- PBS [Biochrom KG; Berlin, D]
- 2 % FKS (bezogen auf Volumen) [Serva; Heidelberg, D]
- 0,1 % NaN<sub>3</sub> (bezogen auf Masse)

*NH<sub>4</sub>Cl-Lyse, Herstellung von 1 Liter:*

- 8,29 g NH<sub>4</sub>Cl (0,15 M) [Sigma; Steinheim, D]
- 1 g KHCO<sub>3</sub> (10,0 mM) [Sigma; Steinheim, D]
- 37,2 mg Na<sub>2</sub>EDTA (0,1 mM) [Sigma; Steinheim, D]
- 800 ml Aqua-dest
- HCl / NaOH - Titration auf einen pH von 7,2 - 7,4
- mit Aqua-dest auf 1 Liter auffüllen

*Lösung D, Zusammensetzung:*

- tri-Natrium-Citrat-Dihydrat [Merck; Darmstadt, D]
- Guanidin-Isothiocyanat [Invitrogene GmbH; Karlsruhe, D]
- Na-Lauroylsarcosin [Sigma; Steinheim, D]
- Citrat [Sigma; Steinheim, D]
- DEPC-H<sub>2</sub>O

**Test- / Reaktions-Kits**

- CaliBRITE™-Beads [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- QuantiBRITE™ PE [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- IMMULITE® IL-6 / IL-8 / IL-10 / TNF- $\alpha$  / LBP / CRP [DPC Biermann; Bad Nauheim, D]
- LUMITEST PCT Assay [BRAHMS Diagnostica GmbH; Berlin, D]
- *ex vivo* LPS-Stimulation Kit [Milenia Biotec GmbH; Bad Nauheim, D]
- PMN Elastase [Milenia Biotec GmbH; Bad Nauheim, D]
- Absolutely RNA Miniprep Kit [Stratagene; La Jolla, USA]
- RNA 6000 Nano LabChip® Kit [Agilent Technologies; Waldbronn, D]
- First Strand cDNA-Synthesis Kit [Amersham Pharmacia; Uppsala, S]

**Software**

- FACSComp™ [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- CellQuest™ [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- QuantiCALC™ [Becton Dickinson; San Jose, USA]
- GeneAmp 5700 Sequence Detection Software [Applied Biosystems; Rodgau-Jügesheim, D]
- MS Office 2000 [Microsoft; Redmont, USA]
- Micrografx Designer Version 7 [iGrafx Inc.; Tualatin, USA]
- SPSS 10.0 for Windows [SPSS Inc.; Chicago, USA]
- MedCalc 6.14 Demo Version [MedCalc Software; Mariakerke, B]
- SAS Version 8 [SAS Inc., Cary, USA]
- StatXact 5 [Cytel Software Corp., Cambridge, USA]

## 3.2 Patienten

Von November 2000 bis Oktober 2001 wurden 97 Patienten aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien für die Studie waren ein Alter

von mindestens 18 Jahren, elektive Operation unter Einschluss der Herzlungenmaschine und postoperative Verlegung auf die Intensivstation. Ausgeschlossen wurden transplantierte Patienten, Patienten mit bekannter HIV-Infektion oder anderen immunologischen Erkrankungen, sowie Patienten, die präoperativ mit Kortikosteroiden behandelt wurden, dialysepflichtig waren oder klinische Zeichen einer Infektion zeigten. Um eine Population von Patienten mit erhöhtem Risiko für das Auftreten für postoperative Komplikationen (Infektionen) zu erhalten, wurden nur solche Patienten eingeschlossen, die mindestens 70 Jahre alt waren und/oder eine präoperative linksventrikuläre Ejektionsfraktion von  $<25\%$  aufwiesen.

Die Studie wurde von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt; Einverständniserklärungen liegen für alle Patienten in schriftlicher Form vor. Außerdem wurden nach Beendigung der Studie bei zehn weiteren Patienten des Deutschen Herzzentrums Berlin, die die genannten Studien-Einschlusskriterien erfüllten, präoperativ jeweils am Abend vor der Operation *ex vivo* Elastase-Bestimmungen durchgeführt, um Referenzwerte für diesen Test zu erhalten. Hier stimmten die Patienten jeweils mündlich zu. Des weiteren wurden RT-PCR-Kontroll-Messungen an 8 gesunden Probanden durchgeführt.

### 3.3 Laborbestimmungen und klinische Datenerhebung

Die Oberflächenexpressionen von HLA-DR, CD86, CD71, CD64, CD11b (auf Monozyten), CD64 und CD11b (auf neutrophilen Granulozyten), die PCT- und LBP-Plasma-Spiegel, die total-IL-8-Spiegel nach Erythrozytenlyse sowie die *ex vivo*-Sekretion von TNF- $\alpha$  wurden postoperativ täglich vom 1. bis zum 3., und wenn möglich bis zum 6. Tag durchgeführt. *Ex vivo*-Elastase-Sekretion wurde am 1. und 2. postoperativen Tag bestimmt, während die IL-6-, IL-10- und CRP-Plasma-Spiegel sowie die leukozytären mRNA-Expressionen von IL-8, IL-10, SOCS-3, Rantes, TNF- $\alpha$  und HO-1 nur am 1. postoperativen Tag gemessen wurden.

Es sei hinzuzufügen, dass für die mRNA-Expressionsbestimmungen anstatt der 81 Studienpatienten beziehungsweise der 56 klinisch ausgewerteten Patienten nur 58 beziehungsweise 41 Patienten herangezogen wurden, da bei einem Teil der Patienten zu Beginn der Studie keine RNA-Präparation durchgeführt werden konnte. Grund hierfür war die Verwendung einer ungeeigneten Lyselösung.

Zusätzlich wurden täglich klinische und paraklinische Daten der Patienten bezüglich des Auftretens von Infektion erhoben, insbesondere die Vergabe von Antibiotika, SIRS-Kriterien, mikrobiologische Befunde, Röntgen-Thoraces, vom DHZB bestimmte CRP-Werte, und andere. Auf dieser Grundlage erfolgte die klinische Einteilung der Patienten (Kapitel 4.1).

### 3.4 Durchflusszytometrische Bestimmung von Oberflächenproteinen

#### Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen oder andere Partikel auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen (FACS<sup>TM</sup>-Methode<sup>1</sup>). Dabei wird die Suspension, in der die Zellen einzeln vorliegen müssen, durch eine Röhre geleitet und mittels einer Mantelflüssigkeit derartig beschleunigt, dass eine laminare, nicht-turbulente Strömung entsteht. Die Zellen gelangen einzeln nacheinander zum Messpunkt, auf den im Falle des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FACS-Calibur<sup>TM</sup>-Durchflusszytometers ein Argon-Laserstrahl (Wellenlänge bei 488 nm) fokussiert ist. Dadurch kommt es zur Streuung des Lichtes, die von den physikalischen Eigenschaften der Zellen abhängt und für jede Zelle einzeln von speziellen Photomultipliern (PMTs) detektiert und in ein digitales Signal umgewandelt wird. Es werden zum einen das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) detektiert, welches vor allem von der Zellgröße abhängt, und zum anderen das 90°-Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), das Aussagen über die innere Struktur der Zelle (Granularität) zulässt. Mit diesen Angaben ist es bereits möglich, die einzelnen leukozytären Populationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) zu unterscheiden und in einem Diagramm (Scatterplot) darzustellen.

Des weiteren können beispielsweise Antigene (Oberflächenmoleküle) einer Zellpopulation qualitativ und quantitativ untersucht werden, indem die Zellen beziehungsweise ihre zu untersuchenden Antigene mit fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern gefärbt werden. Durch das Laserlicht werden die Fluoreszenzmoleküle angeregt und emittieren ihrerseits Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches. Dieses wird nun in 90°-Richtung entsprechend seiner Wellenlänge gefiltert und von zusätzlichen PMTs detektiert. Das FACS-Calibur<sup>TM</sup>-Durchflusszytometer kann über vier solcher PMTs (FL-1 bis -4) unter anderem die Signale von Fluoresceinisothiozyanat (FITC, Erfassung durch FL-1, Emissionsmaximum bei 530 nm), Phycoerythrin (PE, von FL-2 erfasst, Emissionsmaximum bei 580 nm), Peridin-Chlorophyll (PerCP, von FL-3 erfasst, Emissionsmaximum bei 670 nm) und Allophycocyanin (APC, von FL-4 erfasst) detektieren.

Da sich die Lichtemissionen eines Fluoreszenzfarbstoffes über einen größeren Wellenlängenbereich erstrecken und sich die Spektren einiger Farbstoffe überlappen, können die Emissionen eines Farbstoffes auch von anderen als dem einen zugeordneten PMT erfasst

---

<sup>1</sup> FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting

werden. Insbesondere FL-2 erfasst neben dem PE-Signal auch Emissionen, die von FITC ausgehen, wodurch die Messwerte verfälscht werden können. Dieses Problem wird elektronisch korrigiert, was als „Kompensation“ bezeichnet wird.

Mit der Auswertungssoftware ist es möglich, die Zellpopulationen in verschiedenen Parameterkombinationen darzustellen und damit Aussagen über Subpopulationen zu machen (Multiparameteranalyse). Darüber hinaus kann die durchschnittliche Menge an markierten Antikörpern pro Zelle absolut quantifiziert werden, indem mit Hilfe synthetischer Partikel (Beads), die eine bestimmte Anzahl an Farbstoffmolekülen auf ihrer Oberfläche tragen, die gemessenen Signale gemäß einer Standardkurve standardisiert werden.

## **Durchführung**

### *HLA-DR-, CD86- und CD71-Ansätze*

Zu jeweils 50 µl auf Eis gelagerten EDTA-Blutes wurden je 20 µl Antikörperlösung gegeben. Diese enthielt PE-konjugierte Antikörper gegen das jeweilige Antigen und PerCP-CY5.5-konjugierte Antikörper gegen das vor allem auf Monozyten exprimierte Molekül CD14; durch den Cyanofarbstoff CY5.5 wird die Spezifität des Antikörpers für Monozyten zusätzlich erhöht. Es folgte eine 30 minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, danach wurde mit 200 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Erythrozyten mit 0,5 ml FACS<sup>®</sup>-Lysing-Solution für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln lysiert, danach wurde zentrifugiert (200 g), der Überstand entfernt. Als letztes wurde mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen.

### *CD64- und CD11b-Ansätze*

Es wurden 50 µl auf Eis gelagertes EDTA-Blut (CD64) beziehungsweise Heparin-Blut (CD11b) mit jeweils 20 µl Antikörperlösung gemischt, die PE-konjugierte Antikörper gegen CD64 beziehungsweise CD11b und PerCP-konjugierte Antikörper gegen CD45 als Marker für Leukozyten enthielt. Die Bindung der Antikörper an die Antigene erfolgte auch hier während einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, danach wurde bei 200 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Für die Lyse der Erythrozyten wurde 1 ml FACS<sup>®</sup>-Lysing-Solution hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ein Waschschrift erfolgte nicht.

## **Analyse und Auswertung**

Die Messung der Ansätze erfolgte mit einem FACS-Calibur<sup>™</sup> Durchflusszytometer und der zum Gerät gehörigen CellQuest<sup>™</sup>-Software. An jedem Tag wurde zu Beginn der Messung eine

Geräte-Kalibrierung mit dem Programm FACSCComp<sup>TM</sup> und dem „CaliBRITE<sup>TM</sup>-Beads-Kit“ durchgeführt. Dabei wurden synthetische, mit den genannten Fluoreszenzmolekülen bestückte Beads gemessen und die Photomultiplier-Spannungen automatisch eingestellt. Außerdem wurden die elektronische Kompensation und ein Empfindlichkeitstest durchgeführt. Anschließend wurde mit dem „QuantiBRITE<sup>TM</sup> PE-Kit“ die 1:1-Quantifizierung durchgeführt. Dieser Kit enthält vier Populationen von Beads, die jeweils mit einer bestimmten Anzahl von PE-Molekülen bestückt sind. Diese wurden gemessen und die Messwerte (angegeben als geometrische Mittelwerte) der Molekülzahl der jeweiligen Population zugeordnet. Es folgte die Messung der Proben. Schließlich konnte mit dem Programm QuantiCALC<sup>TM</sup> jede Probe ausgewertet und die durchschnittliche Anzahl gebundener Antikörper pro Zelle angegeben werden.

Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen die Erfassung der Monozyten- und Neutrophilen-Populationen während einer Messung, Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Auswertung einer Monozyten-Population mit QuantiCALC<sup>TM</sup>.

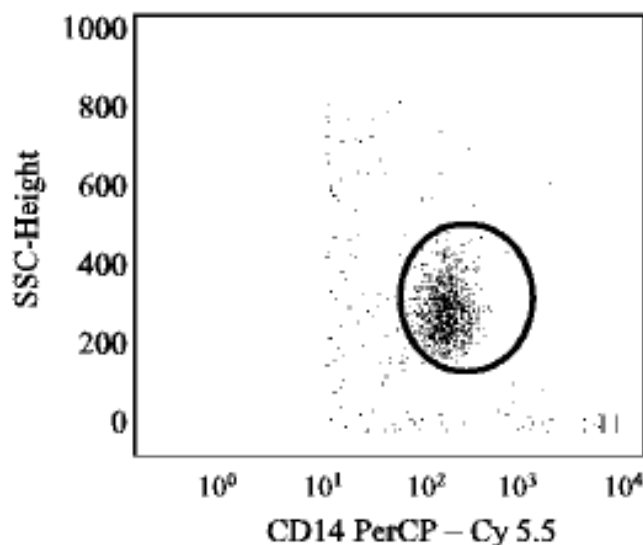


Abbildung 2: Für die Bestimmung von HLA-DR, CD86 und CD71 wurde CD14PerCP-CY5.5 gegen den Side-Scatter aufgetragen, um die Monozyten als „Events“ darzustellen und „gaten“ zu können.



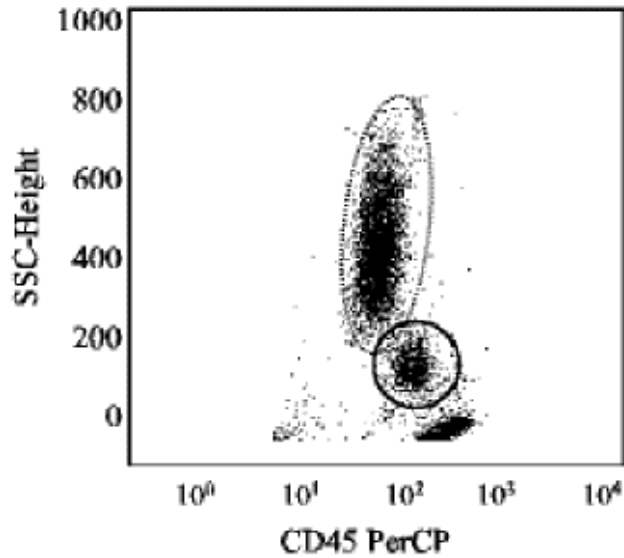


Abbildung 3: Für die Bestimmung von CD64 und CD11b auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten wurden die Monozyten (durchgezogene Linie) und die Granulozyten (gepunktete Linie) mit Hilfe ihrer unterschiedlichen Eigenschaften (Granularität und Stärke der CD45-Expression) „gated“, um sie jeweils gesondert auszuwerten.

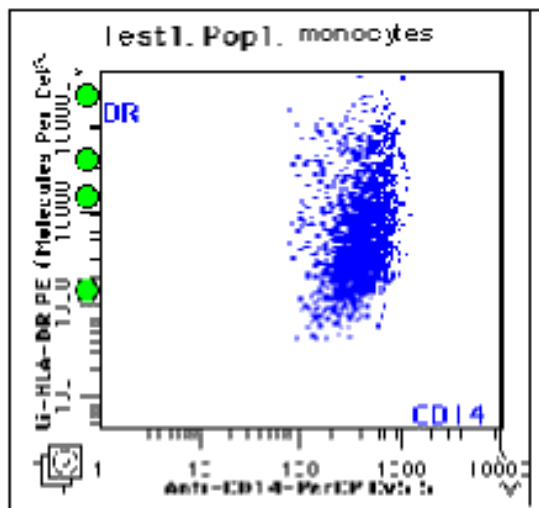


Abbildung 4: QuantiCALC™-Auswertung: Die grünen Punkte auf der Ordinate repräsentieren die mit dem QuantiBRITE™-Kit gemessenen Geomeans, die nun der Einheit „Antikörper pro Zelle“ zugeordnet werden können. Auf den Monozyten dieses Patienten befanden sich durchschnittlich 4939 Anti-HLA-DR-Antikörper.

### 3.5 Konzentrationsbestimmungen humoraler Marker mittels ELISA

#### Grundprinzip des ELISA anhand der *ex vivo* Elastase-Bestimmungen und Erweiterung des Elastase-Messprotokolls

Bislang lagen für die Messung mit dem „Milenia-PMN-Elastase-Kit“ nur Daten für EDTA- und Citrat-Plasma vor, deshalb wurde zunächst anhand von fünf freiwilligen Probanden in einer Versuchsreihe mit EDTA- und Heparin-Blut das Messprotokoll durchgeführt, zudem wurden unterschiedliche Vorverdünnungen der Überstände nach Stimulation (siehe unten) getestet. Es stellte sich heraus, dass heparinisiertes Plasma ebenso geeignet war, und dass eine Verdünnung der Stimationsüberstände von 1:1000 (gegenüber der 1:100-Verdünnung bei der Verwendung von Plasma gemäß der Anleitung des Herstellers, ohne vorherige *ex vivo*-Vollblut-Stimulation) notwendig war, um Werte zu erhalten, die innerhalb des Bereiches der Standardproben lagen (Daten nicht dargestellt).

Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen löslicher Parameter demselben Prinzip des ELISA gehorchen, soll dieses anhand der Messung der *ex vivo* Elastase-Produktion veranschaulicht werden.

100 µl Heparin-Vollblut wurden mit 100 µl auf 1:2000 vorverdünnter Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)-Stock-Lösung (1 mg / ml) und 300 µl RPMI 1640 Zell-Kultur-Medium gemischt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 1000 g zentrifugiert, und der Überstand bei -70°C gelagert, bis mit dem „Milenia-PMN-Elastase-Kit“ der ELISA durchgeführt und die Elastase-Konzentration bestimmt wurde.

Dazu wurden gemäß der Vorversuche und der Anleitung des Herstellers alle Proben auf 1:1000 verdünnt und je 100 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiter-Platte, deren Böden mit Anti-Elastase-Antikörpern beschichtet waren, aufgetragen. Außerdem wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe mit dem mitgelieferten Verdünnungspuffer und dem Standard (1000 ng/ml) über die Konzentrationen 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml und 15,625 ng/ml durchgeführt, das letzte Glied in dieser Reihe und damit der Null-Standard war der Probenverdünnungspuffer. Die Mikrotiterplatte wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, um eine Bindung der Elastase an die an den Böden der Vertiefungen fixierten und damit immobilisierten (primären) Anti-Elastase-Antikörpern zu erzielen. Danach wurde vier mal mit Waschpuffer gewaschen und 150 µl Antikörperlösung hinzugegeben, die an Meerrettichperoxidase gekoppelte (sekundäre) Antikörper gegen Elastase enthielt. Indem erneut für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert wurde, haben sich die

Antikörper-Elastase-Antikörper- (sogenannte „Sandwich“-) Komplexe gebildet, wie sie für das ELISA-Prinzip typisch sind (Abbildung 5). Anschließend wurden 200 µl der Substratlösung hinzupipettiert, die 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) enthält. Dieses wurde während einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur als Substrat farblich umgesetzt. Nach einer Beendigung der Reaktion mit Stopp-Lösung wurde die optische Dichte bei 450 nm mit dem luminometrischen System der Firma Anthos Labtec gemessen, die proportional zur Stärke der Farbbildung und damit zur Konzentration an Elastase in den Proben war.

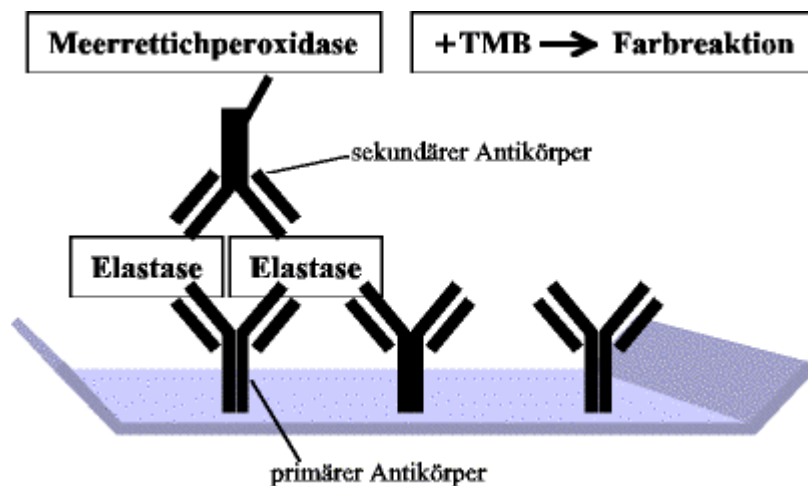


Abbildung 5: „Sandwich-Komplex“ bestehend aus am Boden fixierten primären Anti-Elastase-Antikörpern, daran gebundenen Elastase-Molekülen und einem flüchtigen sekundären Anti-Elastase-Antikörper, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt TMB als Substrat farblich um. Die Stärke der Farbreaktion ist proportional zur Konzentration an Elastase in der Lösung.

Anhand einer Standardkurve, die aus den gemessenen Standards mit den bekannten Konzentrationen hervorging, wurden die Konzentrationen der Proben angegeben. Zusätzlich wurden Kontroll-Proben mituntersucht, die festgelegte Elastase-Mengen enthielten, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

### Bestimmung von IL-6, total-IL-8, Plasma-IL-10, LBP, CRP und PCT

Ein ELISA mit sehr wenig Arbeitsaufwand und hohem Standardisierungsgrad ist der halb-automatische „IMMULITE®-Chemilumineszenz-Immunoassay“, mit dem die Konzentrationen von IL-6, total-IL-8, Plasma-IL-10, LBP, und CRP bestimmt wurden. Als feste Phase enthielten die mitgelieferten Reaktionsgefäße kleine beschichtete Kügelchen, und als Antikörper-gekoppeltes Enzym fungierte die Alkalische Phosphatase.

Im Falle des IL-8 wurde zur Lyse der Erythrozyten zuvor Vollblut mit Milenia-Zell-Lyse-Lösung im Verhältnis 1:1 versetzt. Hintergrund hierfür ist die Tatsache, dass im Blut IL-8 von

Erythrozyten abgebunden wird und somit durch „konventionelle“ IL-8-Plasma-Bestimmungen nur Sekretions-Spitzen messbar sind, die die Bindungskapazität der Erythrozyten übersteigt. Durch die vorherige Lyse der Erythrozyten wird bei den IL-8-Bestimmungen neben dem Plasma-IL-8 auch das abgebundene IL-8 erfasst (→ „total-IL-8“). In verschiedenen Messreihen konnte gezeigt werden, dass Plasma-IL-8-Werte und total-IL-8-Werte gut korrelierten, wobei nur das total-IL-8 regelmäßig im messbaren Bereich lag (unveröffentlichte Daten, Institut für Medizinische Immunologie, CCM).

PCT wurde mit einem Kit der Firma Brahms Diagnostica und dem Luminometer „Beri-Lux Analyzer 250“ der Firma Behring gemäß der Arbeitsanleitung des Herstellers gemessen.

### **Monozytäre *ex vivo* TNF- $\alpha$ Sekretionskapazität**

Es wurden nur die im Stimulations-Kit enthaltenen, pyrogenfreien und einzeln verpackten Materialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) verwendet, um zusätzliche Stimuli für die TNF- $\alpha$ -Bildung möglichst auszuschließen.

50  $\mu$ l heparinisiertes, bei Raumtemperatur gelagertes Blut wurden mit 500  $\mu$ l LPS-Lösung (500 pg/ml) versetzt und zur Stimulation der Monozyten für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1000 g wurde der Überstand bei -70°C gelagert, bis zur Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration der „IMMULITE®-Chemilumineszenz-Immunoassay“ durchgeführt wurde.

## **3.6 Bestimmung der leukozytären mRNA-Expression mittels RT-PCR**

Um die Expression bestimmter Gene quantitativ untersuchen zu können, ist es zuvor notwendig, aus Zellmaterial die RNA zu präparieren und diese in cDNA umzuschreiben, da für RT-PCR-Messungen nur DNA verwendet werden kann.

### **3.6.1 Leukozytenpräparation**

Vor Beginn wurde Ammoniumchlorid-Lyse-Lösung hergestellt (siehe Kapitel 3.1). Aus den auf Eis gelagerten EDTA-Monovetten wurde der zwischen der erythrozytären Phase und der Plasmaphase nach Zentrifugation mit 1000 g befindliche „Leukozytenrasen“ in eine 500  $\mu$ l Pipettenspitze aufgenommen, so dass man neben Lymphozyten und Monozyten auch die granulozytäre Fraktion erhielt. Zu der Leukozytenlösung wurden 5 ml NH<sub>4</sub>Cl-Lyse gegeben und anschließend für fünf Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert wurde jeweils bei 250 g. Zu den

Zellpellets wurden abschließend 500 µl Lösung D und 3,5 µl Mercaptoethanol zur Auflösung der Zellmembranen und Inaktivierung von RNAsen gegeben, und die so erhaltenen Zelllösungen wurden bis zur RNA-Präparation bei –70°C gelagert.

### **3.6.2 RNA-Präparation und Quantifizierung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer**

Die Präparation der RNA erfolgte mit dem „Absolutely RNA Miniprep Kit“ (Stratagene) und den darin enthaltenen Reagenzien. Zentrifugiert wurde jeweils bei 14000 g.

Die in Lösung D und Mercaptoethanol gelösten Zellproben wurden zwecks Auflösung eventueller Zellklumpen auf einen Prä-Filter gegeben und für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden zum Filtrat jeweils 600 µl 70%-Ethanol hinzugegeben und für fünf Sekunden gevortext. Das Gemisch wurde auf einen RNA-Bindungsfilter gegeben, dessen Silikabeschichtung die RNA bindet. Nach einminütiger Zentrifugation wurde mit 600 µl Low-Salt-Wash-Puffer gewaschen und 2 mal zentrifugiert (je eine Minute). 5 µl DNase-Lösung plus 50 µl DNase-Digestion-Puffer wurden auf den Filter gegeben und für 15-30 Minuten bei 37°C inkubiert, um eventuell vorhandene Verunreinigungen mit genomischer DNA zu entfernen. Anschließend folgten drei Waschschrte, mit 600 µl High-Salt-Puffer, 600 µl Low-Salt-Puffer und 300 µl Low-Salt-Puffer (jeweils Zentrifugation für 1-2 Minuten). Als letztes wurde die RNA mit 60°C warmen Elutionspuffer eluiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei –70°C tiefgefroren.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem „RNA 6000 Nano LabChip®Kit“ unter Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers. Dabei wurde jeweils 1 µl der RNA-Lösung auf einem Chip aufgetragen. In einer im Chip enthaltenen Kapillare wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt, und durch Fluoreszenzmarkierung (durch Zugabe des „Gel Dye Mix“) wurden die Fluoreszenzsignale zeitlich aufgelöst widergegeben und in Beziehung zu einer Standardprobe mit bekanntem RNA-Gehalt gesetzt. Auf diese Weise wurden die Konzentrationen der 18-S und 28S-rRNA ermittelt; außerdem erlaubte die graphische Darstellung der Signale Rückschlüsse auf die Qualität der RNA.

### **3.6.3 Reverse Transkription mit dem „First Strand cDNA-Synthesis Kit“**

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden 2 µl Oligo-dT-Primer-Lösung mit 18 µl RNA-Lösung gemischt und bei 75°C für 10 Minuten zur Beseitigung von Sekundärstrukturen vorinkubiert und danach abgekühlt. Nach Zugabe von 8 µl First Strand Buffer, 4 µl Dithiothreitol, 4 µl dNTP, 2 µl DNase und 0,5 µl RNase-Inhibitor erfolgte bei 37°C für 30 Minuten ein weiterer Verdau potenziell vorhandener genomischer DNA. Danach wurden die Proben zur Inaktivierung der DNase für 5 Minuten bei 75°C erhitzt und anschließend auf Eis

abgekühlt. Nun erfolgte die eigentliche Transkription durch Zugabe von 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase und 1 µl RNase-Inhibitor während einer 60-minütigen Inkubation bei 42°C. Danach wurde das Enzym durch Inkubation bei 94°C für 5 Minuten inaktiviert, die Proben entweder weiterverarbeitet oder bei –20°C gelagert.

Da trotz des zweimaligen Entfernens von DNA (während der RNA-Präparation und während der Transkription von RNA in cDNA) eine Kontamination mit genomischer DNA nicht ausgeschlossen werden kann, wurde zu jedem Ansatz ein weiterer RT<sup>-</sup>-Ansatz, bei dem keine Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde, mitgeführt, um später mittels PCR und genomischer Amplifikationsprimer solche Verunreinigungen erkennen zu können.

### **3.6.4 TaqMan® Real Time Reverse Transkriptase (RT) Polymerase-Kettenreaktion**

#### **Grundlagen**

Ausgehend von DNA-Proben werden bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Genabschnitte / Nukleinsäurefragmente amplifiziert, um entweder das Vorhandensein eines Gens qualitativ nachzuweisen (konventionelle PCR), oder um die Menge an DNA-Ausgangsmaterial quantitativ zu bestimmen (Real-Time-RT-PCR).

Analog zur Nukleinsäuresynthese *in vivo* fungieren als „Ausgangsnukleotide“ ein Forward-Primer (DNA-Fragment, welches am 5′-3′-Strang bindet) und ein Reverse-Primer (am 3′-5′-Strang bindendes Fragment). Nach Aufspaltung des DNA-Doppelstranges in seine beiden Einzelstränge (Denaturierung) binden die beiden Primer jeweils an den Abschnitt des komplementären DNA-Fragmentes der präparierten cDNA. Die Amplifikation geschieht durch eine hitzestabile Polymerase, die an die Primer jeweils ein zum vorhandenen Strang komplementären neuen Strang synthetisiert (Extensionsphase). Danach werden die neu synthetisierten Fragmente ebenfalls denaturiert, und es kommt zu einer weiteren Extensionsphase. Es können zahlreiche Zyklen aufeinanderfolgen, wobei sich im Idealfall mit jedem Zyklus die Menge der synthetisierten DNA verdoppelt (Amplifikations-Effizienz = 1).

Im Unterschied zur konventionellen PCR bindet bei der TaqMan®-Real-Time-RT-PCR neben den beiden Primern ein zusätzliches Oligonukleotid, die sogenannte TaqMan®-Sonde. Diese ist an zwei Stellen fluoreszenzmarkiert: am 5′-Ende mit einem sogenannten Reporterfarbstoff (zum Beispiel FAM), der nach Anregung Licht mit einer Wellenlänge von 518 nm (FAM) emittiert, und in der Nähe des 3′-Endes mit TAMRA (nach Anregung Lichtemission bei 582 nm). Durch die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe zueinander (an der intakten Sonde) wird die Emission des Reporterfarbstoffes aufgrund eines Fluoreszenz-Energietransfers (FET) durch TAMRA

unterdrückt, TAMRA fungiert somit als Quencher. Das Enzym zur Amplifikation ist die AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase, welche zu ihrer Polymerase-Aktivität zusätzlich eine 5'-3'-Nuklease-Aktivität besitzt. Dadurch wird während der Synthesephase die Sonde hydrolysiert und damit vom 5'-3'-Strang verdrängt, wenn der neu synthetisierte Strang, beziehungsweise die AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase, auf die gebundene Sonde trifft, wobei von der Hydrolyse-Aktivität nur die gebundene, nicht aber die (noch) ungebundene Sonde betroffen ist. Die Konsequenz ist, dass das Signal des Reporterfarbstoffes nun nicht mehr vom Quencherfarbstoff unterdrückt werden kann. Deshalb ist es nun möglich, mittels eines Argonlasers (488 nm) den Reporterfarbstoff anzuregen und das Signal zu detektieren. Die Stärke des Signals ist direkt proportional zur Menge des amplifizierten DNA-Produkts und nimmt im Verlauf der Synthese von Zyklus zu Zyklus zu. Es hängt entscheidend von der Ausgangsmenge des entsprechenden DNA-Fragmentes beziehungsweise von der ursprünglichen Menge an mRNA ab und wird auf das Fluoreszenzsignal eines in der Regel konstant exprimierten Genes (House Keeping Gen) bezogen, welches im selben RT-PCR-Lauf synthetisiert wird. Auf diese Weise kann die relative Genexpression berechnet werden.

Abbildung 6 und Abbildung 7 geben die entscheidenden biochemischen Reaktionen während eines Zyklus grafisch wieder.

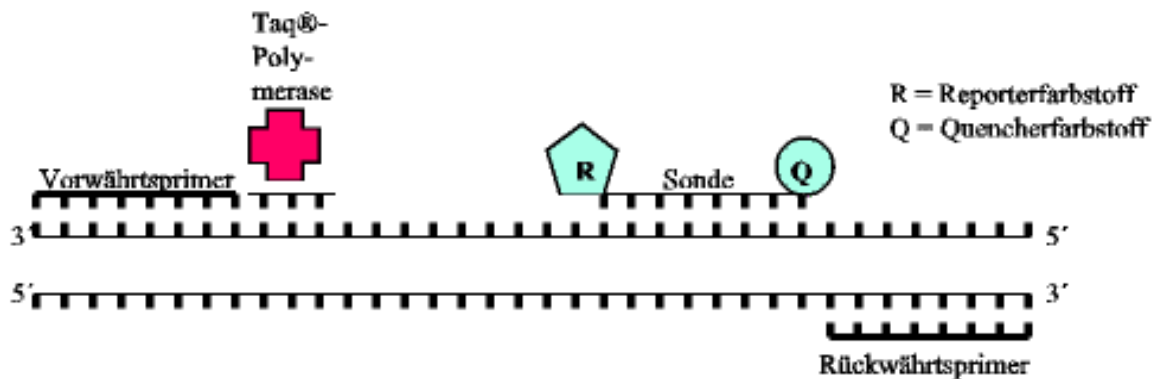


Abbildung 6: Beginn der Polymerisation. An den am 3'-Ende gebundenen Primer synthetisiert die Taq®-Polymerase einen komplementären neuen Strang. Durch die intakte Sonde wird das Reportersignal vom Quencher durch FET unterdrückt.

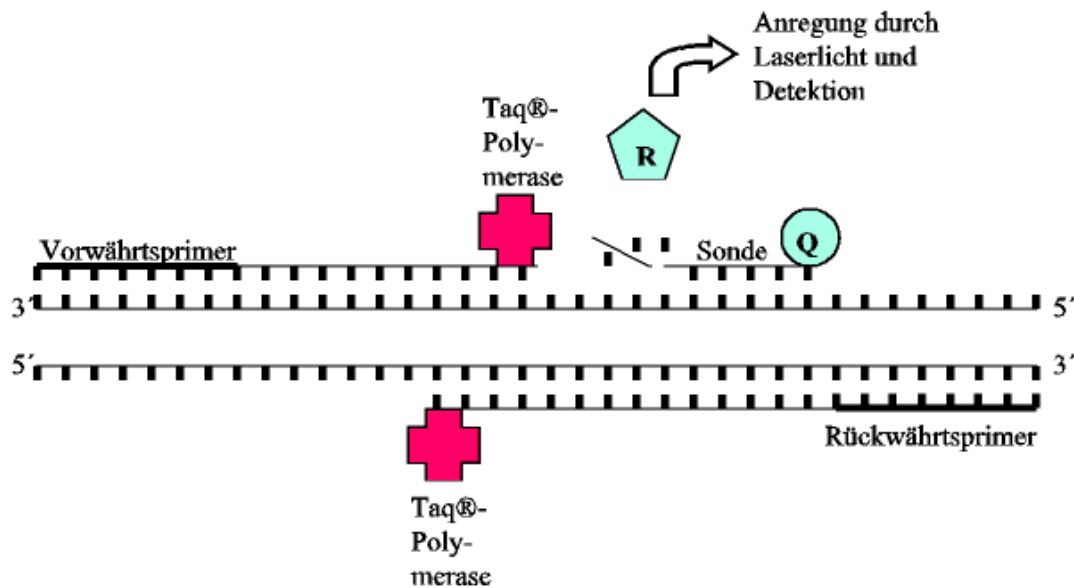


Abbildung 7: Stößt die Taq®-Polymerase auf die in der Nähe des Primers gelegene Sonde, wird diese durch die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert, so dass das Reportersignal nun nicht mehr unterdrückt wird und nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) detektiert werden kann.

## Durchführung

Alle Ansätze wurden zur Optimierung der Genauigkeit der Ergebnisse als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 1 µl cDNA, 1 µl Sonde, 6 µl Primermix (Forward- und Reverse-Primer in entsprechendem Verhältnis, siehe Kapitel 3.6.5) und 4,5 µl Aqua dest in ein Reaktionsgefäß (Optical Tube) pipettiert. Außerdem wurden 12,5 µl Mastermix hinzugefügt, der aus folgenden Komponenten besteht:

- die AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase
- dNTPs (Nukleotidtriphosphatmoleküle) mit Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil als Basen
- Uracil-N-Glycosylase (UNG) zum Verdau eventuell vorhandener PCR-Produkte (Carry-over-Kontaminationen) an der Stelle des Uracils
- MgCl<sub>2</sub>: Koenzym der Polymerase und Unterstützung des Quenching-Effektes durch Beeinflussung der Sekundärstruktur der Sonde
- ROX als passiver Referenzfarbstoff: indem das normalisierte Reportersignal (Quotient aus der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der des passiven Referenzfarbstoffes) angegeben wird, werden unspezifische Einflüsse wie



## Konzentrationsänderungen wegen Schwankungen des Volumens (Pipettierfehler) teilweise ausgeglichen

Als Housekeeping-Gen wurde ein Panel für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) eingesetzt. Um die Proben auf Kontaminationen mit genomischer DNA zu untersuchen, wurden für jedes Panel No Template Controls (NTCs, Negativ-Kontrollansätze ohne cDNA) angesetzt, sowie für jede cDNA eine RT<sup>-</sup>-Probe mit einem kreuzreaktiven Histone-Panel, welches genomische DNA detektiert. *Tabelle 1* gibt die Sequenzen der verwendeten Panel an.

*Tabelle 1:* Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden.

Panel		Sequenzen
HPRT	Sonde	5'-TTT-CAC-CAG-CAA-GCT-TGC-GAC-CTT-GA-3'
	forward	5'-AGT-CTG-GCT-TAT-ATC-CAA-CAC-TTC-G-3'
	reverse	5'-GAC-TTT-GCT-TTC-CTT-GGT-CAG-G-3'
Histone	Sonde	5'-GCA-AGT-GAG-GCC-TAT-CTG-GTT-GGC-CTT-T-3'
	forward	5'-CCA-GAG-CGC-AGC-TAT-CGG-T-3'
	reverse	5'-CAC-GTT-TGG-CAT-GGA-TAG-CAC-3'
IL-8	Sonde	5'-ACT-GCA-CCT-TCA-CAC-AGA-GCT-GCA-GAA-ATC-3'
	forward	5'-CTA-AGT-TCT-TTA-GCA-CTC-CTT-GGC-AA-3'
	reverse	5'-TGA-CTT-CCA-AGC-TGG-CCG-T-3'
IL-10	Sonde	5'-AAA-GAA-AGT-CTT-CAC-TCT-GCT-GAA-GGC-ATC-TCG-3'
	forward	5'-CAA-GTT-GTC-CAG-CTG-ATC-CTT-CAT-3'
	reverse	5'-GGC-AAC-CTG-CCT-AAC-ATG-CTT-3'
TNF- $\alpha$	Sonde	5'-TGT-AGC-CCA-TGT-TGT-AGC-AAA-CCC-TCA-AGC-3'
	forward	5'-TCT-CGA-ACC-CCG-AGT-GAC-AA-3'
	reverse	5'-TCA-GCC-ACT-GGA-GCT-GCC-3'
HO-1	Sonde	5'-TGC-TCA-ACA-TCC-AGC-TCT-TTG-AGG-AGT-TG-3'
	forward	5'-GAA-GAG-GCC-AAG-ACT-GCG-TTC-3'
	reverse	5'-TGG-TCC-TTG-GTG-TCA-TGG-GT-3'
Rantes	Sonde	5'-CAA-CCC-AGC-AGT-CGT-CTT-TGT-CAC-CC-3'
	forward	5'-TTT-CTA-CAC-CAG-TGG-CAA-GTG-CT-3'
	reverse	5'-GCA-CAC-ACT-TGG-CGG-TTC-TT-3'
SOCS-3	Sonde	5'-CCA-GCG-CCA-CTT-CTT-CAC-GCT-CAG-3'
	forward	5'-CTT-TCT-GAT-CCG-CGA-CAG-CT-3'
	reverse	5'-TCA-CAC-TGG-ATG-CGC-AGG-T-3'

Die TaqMan®-Läufe wurden mit dem „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ durchgeführt. Dies ist ein Thermocycler, der maximal 96 Reaktionsansätze nach einem bestimmten Programm zu erhitzen und abzukühlen vermag und dadurch die biochemischen Reaktionen ermöglicht. Dabei wird der Strahl eines Argon-Lasers (Wellenlänge von 488 nm)

über einen Multiplexer auf die Proben geleitet, so dass die Reportermoleküle (FAM), die in den Synthesephasen eines Laufes durch die Hydrolyse der Sonden frei werden, angeregt werden. Ihr emittiertes Licht wird nun mittels einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Ein TaqMan®-Lauf besteht aus vier Schritten:

1. Zuerst wird für 2 Minuten bei 50°C der UNG-Verdau durchgeführt.
2. Dann wird für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die UNG zu inaktivieren und gleichzeitig die AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase zu aktivieren.
3. Als drittes wird für 15 Sekunden bei 95°C die cDNA denaturiert und für 60 Sekunden bei 60°C das Annealing (Andocken der Primer und Sonden) und die Extension (Synthese durch die Polymerase) durchgeführt. Dieser Schritt wird 40 mal wiederholt (40 Zyklen)...
4. ...bis die Proben bei 4°C gekühlt werden, und der PCR-Lauf damit beendet wird.

Ausgewertet wurde mit der zugehörigen Software „GeneAmp 5700 Sequence Detection Software“, welche die normalisierten Reportersignale der einzelnen Ansätze im Verlauf der 40 Zyklen angibt. Dabei wurde für jede Probe diejenige Zyklenzahl bestimmt, bei der erstmalig ein statistisch signifikantes Signal über dem Grundrauschen (unspezifisches Basissignal, zu Beginn eines PCR-Laufes einziges Signal) detektiert werden konnte: der Threshold Cycle ( $C_T$ ). Dieser gibt somit an, wie vieler Amplifikationszyklen es bedurfte, um messbare Mengen an Produkt zu erhalten. Die  $C_T$ s der Doppelansätze durften zwecks Messgenauigkeit um nicht mehr als einen halben Zyklus ( $C_T < 0,5$ ) voneinander abweichen, ansonsten wurde der Ansatz wiederholt. Für die weiteren Berechnungen wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte verwendet.

Bei einem  $C_T > 35$  war die Ausgangskonzentration der cDNA derart gering, dass eine Messung unter Umständen nicht mehr reproduzierbar gewesen wäre und somit von den Auswertungen ausgeschlossen wurde.

Zur Berechnung des dimensionslosen Ergebnisses für ein Zielgen wurde zunächst die Differenz zwischen dem  $C_T$  der interessierenden Sequenz und von HPRT bestimmt ( $\Delta C_T$ ). Da die Panel für eine Real-Time-RT-PCR so konstruiert werden, dass die Effizienzen bei annähernd 1 liegen, gilt entsprechend den Ausführungen von Livak und Schmittgen [102]:

Ergebnis (auf ein Housekeeping-Gen normalisierte und zu einer Kontrollprobe relativierte Gen-Expression) =  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ .

### **3.6.5 Etablierung eines Panels**

Ein TaqMan®-Panel beinhaltet die erwähnten Primer (Forward- und Reverse-Primer) und die Sonde der zugehörigen mRNA. Ein Primer besteht aus 18 bis 28 Basen, der GC-Gehalt soll circa 50 % betragen, es soll möglichst keine Poly-T-Bereiche geben. Zur Vermeidung / möglichst geringen Bildung von Dimeren soll nur eine geringe Komplementarität zwischen beiden Primern bestehen. Man bevorzugt wegen der erhöhten Reinheit HPLC-gereinigte Primerlösungen. Folgende Kriterien sollten beim Design einer Sonde beachtet werden:

- die Länge sollte circa 20 bis 30 Basen betragen
- das 5'-Ende sollte sich in relativer Nähe (möglichst 4 bis 5, höchstens 50 Basen) zum 3'-Ende des Primers befinden
- der Guanin/Cytosin-Gehalt sollte 40 bis 60 % betragen, wobei der Anteil des Cytosins über dem des Guanins liegen sollte
- die Schmelztemperatur muss 5 bis 10°C über der der Primer liegen
- es sollten nicht mehr als drei selbige Basen hintereinander liegen, insbesondere keine Poly-Gs
- am 5'-Ende (Ort des Reporterfarbstoffes) sollte wegen des quenchenden Einflusses kein Guanin stehen
- Komplementarität zwischen Sonde und Primern sollte zur Verhinderung von Bindungen vermieden werden

Außerdem sollte die Sonde direkt mittig über die Exongrenzen gelegt werden, da auf diese Weise die Kreuzreaktivität mit genomischer DNA verhindert wird. Die Länge des Amplikons sollte circa 70-110 Basenpaare lang sein, da mit zunehmender Amplikonlänge die Effizienz der PCR stark abnimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Etablierung eines Panels für SOCS-3 (ab Primertitration) zu Ende geführt. Nachdem im Vorfeld die entsprechenden Sequenzen gemäß den genannten Kriterien herausgesucht und weitere Übereinstimmungen mit dem humanen Genom ausgeschlossen worden waren, waren sie bei der Firma Metabion (Primer) beziehungsweise Eurogentec (Sonde) zur Synthese in Auftrag gegeben worden.

Zur Bestimmung der optimalen Primerkonzentrationen für das SOCS-3-Panel wurde eine Titration der Primer mit jeweils 50 nM, 300 nM und 900 nM durchgeführt, und diejenige

Kombination mit dem frühesten  $C_T$  und der höchsten Fluoreszenz ermittelt. Zur Bestimmung der Effizienz der Amplifikation mit diesem Panel wurde eine Verdünnungsreihe von für SOCS-3 stark positiver cDNA angefertigt, wobei in vier Stufen die cDNA jeweils auf ein Viertel verdünnt wurde. Mit diesem cDNA-Material wurde daraufhin ein PCR-Lauf mit dem SOCS-3-Panel und mit HPRT als Housekeeping-Gen durchgeführt. Es wurde in einem Koordinatensystem der Threshold Cycle gegen den Logarithmus der cDNA-Verdünnungen aufgetragen und durch lineare Regression eine Standardkurve erstellt. Da der Betrag der Steigung unter 0,01 lag, wurden die Effizienzen von HPRT und SOCS-3 für in etwa gleich ( $\approx 1$ ) angenommen.

### **3.7 Exploratorische Analyse (deskriptive Statistik) und Interferenz-Statistik (konfirmatorische Analyse)**

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit SPSS 10.0, MedCalc 6.14 Demo Version, SAS, StatXact, MS Excel, Micrografx Designer und MS PowerPoint. Es wurden Boxplots mit Angabe der Mediane, der 75% ( $Q_O$ )- und der 25% ( $Q_U$ )-Perzentilen und der inneren Eingrenzung ( $Q_O + 1,5 \cdot (Q_O - Q_U)$  beziehungsweise  $Q_U - 1,5 \cdot (Q_O - Q_U)$ ) ohne Berücksichtigung der Ausreißer dargestellt. Aufgrund der schiefen Verteilung der Merkmale wurden nonparametrische Tests für nicht-normalverteilte Stichproben angewendet: ausgehend von einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  wurden zur Untersuchung auf Parameterunterschiede zwischen Patientengruppen der Kruskal-Wallis- und bei dessen Signifikanz der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Für die Beziehungen der Parameter untereinander wurden nonparametrische Varianzanalysen durchgeführt, zusätzlich wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman für nicht normalverteilte Merkmale ermittelt.

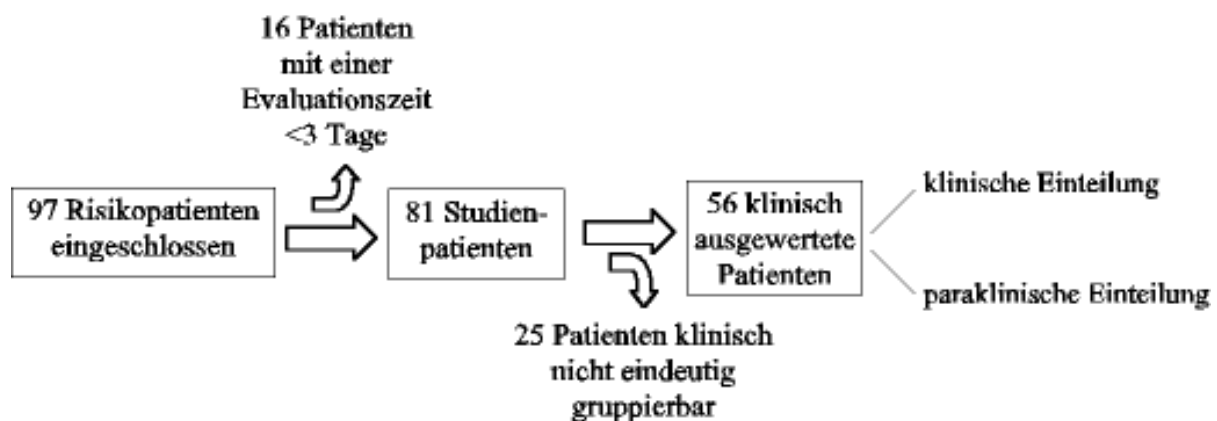
Für die Auswertung der Marker bezüglich ihrer diskriminativen Aussagekraft – Entwicklung versus keine Entwicklung von Infektion – wurden Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurven erstellt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Klinische und paraklinische Einteilung der Patienten

Von den 97 eingeschlossenen Studienpatienten wurden nach Ende der Studie diejenigen mit einer Studien-Evaluationszeit von weniger als drei Tagen ( $n=16$ ) ausgeschlossen, um ein Monitoring der Immunmarker zumindest über drei Tage auswerten zu können, so dass die Studienpopulation aus 81 Patienten bestand.

Für die *klinische Auswertung der Studie* wurden weitere 25 Patienten herausgenommen, entweder weil die Patienten über die allgemein übliche Dauer hinaus eine prophylaktische antibiotische Behandlung erfuhren ( $>48$  Stunden,  $n=13$ ), oder weil einer antibiotischen Behandlung keine eindeutigen klinischen Zeichen einer Infektion zuzuordnen waren, beziehungsweise weil klinische Infektionszeichen ohne antibiotische Behandlung vorlagen ( $n=12$ ). In *Abbildung 8* ist der Ausschluss der Patienten, ausgehend von den 97 initial eingeschlossenen Patienten, zusammengefasst.



*Abbildung 8:* Studienpatienten. Von ursprünglich 97 eingeschlossenen Patienten wurden 56 klinisch ausgewertet.

Die verbleibenden 56 Patienten wurden klinisch in drei Gruppen eingeteilt: A) Patienten ohne Infektion ( $n=33$ , 59 %), B) Patienten mit klinischen und paraklinischen Zeichen einer Infektion ohne Erregernachweis (Patienten mit vermuteter Infektion,  $n=14$ , 25 %) und C) Patienten mit Infektion, die mikrobiologisch bestätigt werden konnte durch den Nachweis eines klinisch signifikanten Keimes ( $n=9$ , 16 %).

Patienten ohne Infektion erhielten eine perioperative antibiotische Infektionsprophylaxe von bis zu 48 Stunden, ohne dass sich bei diesen Patienten Zeichen einer Infektion zeigten. Patienten mit

vermuteter Infektion waren solche Patienten, bei denen eine antibiotische Therapie von den behandelnden Ärzten aufgrund von klinischen Verdachtszeichen angesetzt wurde. Außerdem mussten bei diesen Patienten mindestens zwei positive SIRS-Kriterien vorliegen (Körpertemperatur  $>38^{\circ}\text{C}$  oder  $<36^{\circ}\text{C}$ , Herzfrequenz  $>90$  / Minute, Atemfrequenz  $>20$  / Minute oder  $\text{Pa}(\text{CO}_2) <32$  mmHg oder Anschluss an ein Beatmungsgerät, Leukozyten im Blut  $>12000$  oder  $<4000$  /  $\mu\text{l}$ ) [4], und dazu mindestens eines der folgenden Kriterien: Anforderung von mikrobiologischen Kulturen, eitriges Trachealabsaugung, bronchopulmonare Infiltration im Röntgen-Thorax-Bild, starker Anstieg des CRP oder besonders starker Anstieg der Blutleukozyten (CRP und Leukozyten wurden vom DHZB routinemäßig bestimmt). Im Falle von fehlenden Informationen über die Atemfrequenz wurde nur ein positives SIRS-Kriterium akzeptiert und der Patient / die Patientin in eine der Gruppen mit Infektion eingeteilt.

*Tabelle 2* gibt einen Überblick über die Verteilung der Patienten auf die drei klinischen Gruppen, *Tabelle 3* gibt die Erreger und die Orte des Erregernachweises bei den Patienten mit mikrobiologisch bestätigter Infektion an (Gruppe C).

*Tabelle 2:* Alter (Mediane und Bereiche), Geschlecht, Beobachtungszeit und Todesfälle in den drei Patientengruppen.

	A: ohne Infektion	B: Verdacht auf Infektion	C: bestätigte Infektion
n=	33	14	9
Alter	74 (42-86)	74 (53-79)	76 (61-81)
Geschlecht m/f	22/11	6/8	3/6
Beobachtungszeit			
Tage 1-3	17	2	1
Tage 1-4	12	3	2
Tage 1-5	3	3	0
Tage 1-6	1	6	6
Todesfälle	0	0	0

*Tabelle 3:* Gruppe C: Kultur-positive Patientengruppe. Material und nachgewiesene Keime.

Material	n=	nachgewiesene Mikroorganismen, jeweils
Trachealsekret	5	Escherichia coli, Blastomyces, Neisseria und Candida albicans, Enterococcus und Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae und Blastomyces
Broncho-Alveolar-Lavage (BAL)	1	Haemophilus parainfluenzae und Streptococcus viridans
Sputum	1	Blastomyces
Sternum, Wunde	1	Staphylococcus Koagulase negativ
sowohl BAL als auch Blut (Zentraler Venenkatheter)	1	Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus und Blastomyces (BAL), Enterococcus faecalis und Pseudomonas aeruginosa (Blut)

Eine *paraklinische Patienteneinteilung* berücksichtigte den Grad der Immunaktivierung frühzeitig nach der Operation und wurde in Beziehung zur monozytären HLA-DR-Erholung im 6-tägigen postoperativen Verlauf gesetzt. Dafür wurden die 56 ausgewerteten Patienten entsprechend der Über-/ Unterschreitung von Schwellenwerten in den Immunparametern total-IL-8, PCT und Plasma-IL-10 am Tag 1 (siehe Kapitel 4.6.1) in jeweils 2 Gruppen eingeteilt, und der Verlauf der HLA-DR-Expression wurde ausgewertet.

## **4.2 Werte der gemessenen Parameter**

*Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6* geben die Mediane und die 25%- und 75%-Perzentilen aller gemessenen Parameter in den drei Patientengruppen wider.

Da für die *ex vivo* Elastase-Produktion und für die mRNA-Untersuchungen noch keine Normalwerte bekannt waren, wurden diese zunächst an einer Population von 10 präoperativen Patienten, die die Studieneinschlusskriterien erfüllten (für die *ex vivo* Elastase-Produktion), beziehungsweise an 8 gesunden Probanden (für die mRNA-Untersuchungen) ermittelt.

**Tabelle 4:** Mediane (sowie 25%- und 75%-Perzentile) der gemessenen löslichen Faktoren und *ex vivo* Stimulationstests in den 3 Patientengruppen, sowie die *ex vivo* Elastase-Produktion bei 10 präoperativen Patienten. In den Infektionsgruppen (Gruppen B und C) sind signifikant unterschiedliche Werte im Vergleich zur Gruppe A fett dargestellt. Die *ex vivo* Elastase-Werte der 10 präoperativen Patienten sind signifikant niedriger als die Patientenwerte.

		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
		n=33	n=33	n=33	n=16	n=4	n=1
<b>Gruppe A (keine Infektion)</b>	IL-10 (pg/ml)	5 (5-6)					
	PCT (pg/ml)	374 (326-782)	292 (204-753)	312 (182-619)	320 (149-542)	230 (168-373)	284
	LBP (µg/ml)	17,1 (14,8-21,8)	24,3 (20,9-28,4)	24,4 (21,5-30,7)	20,7 (18,1-24,1)	25,7 (19,2-32,2)	24,3
	total-IL-8 (pg/ml)	206 (165-259)	180 (163-235)	137 (108-182)	138 (113-176)	129 (128-169)	157
	CRP (mg/dl)	5,8 (4,8-7,7)					
	IL-6 (pg/ml)	38,6 (27,2-67,0)					
	<i>ex vivo</i> Elastase (ng/ml)	183 (131-214)	164 (131-203)	<i>ex vivo</i> Elastase bei 10 präoperativen Patienten: <b>116 (79-131)</b>			
	<i>ex vivo</i> TNF-α (pg/ml)	291 (238-355)	352 (301-411)	360 (299-476)	409 (231-549)	523 (474-561)	367
	Neuinfektionen	n=14 3	n=14 6	n=14 4	n=12 1	n=9 0	n=6 0
<b>Gruppe B (vermutete Infektion)</b>	IL-10 (pg/ml)	6,1 (5-7,6)					
	PCT (pg/ml)	729 (193-5769)	<b>585 (349-3753)</b>	662 (307-2557)	706 (285-2048)	1008 (753-1613)	339 (244-987)
	LBP (µg/ml)	18,1 (15-20,4)	27,7 (21,8-28,8)	23,5 (20,4-31,7)	22,9 (19,8-26,4)	20,7 (16,8-33,4)	15,4 (14,7-22,8)
	total-IL-8 (pg/ml)	<b>310 (191-610)</b>	<b>314 (249-675)</b>	<b>275 (200-347)</b>	<b>253 (178-456)</b>	460 (174-1027)	217 (122-518)
	CRP (mg/dl)	6,3 (5,9-7,2)					
	IL-6 (pg/ml)	42,5 (35,4-73,7)					
	<i>ex vivo</i> Elastase (ng/ml)	<b>248 (225-314)</b>	<b>273 (203-329)</b>				
	<i>ex vivo</i> TNF-α (pg/ml)	409 (290-645)	449 (360-620)	272 (172-419)	374 (305-454)	359 (317-671)	330 (229-407)
	Neuinfektionen	n=9 3	n=9 2	n=9 1	n=8 0	n=6 1	n=6 2
<b>Gruppe C (mikrobiell bestätigte Infektion)</b>	IL-10 (pg/ml)	<b>9,0 (6,5-17,9)</b>					
	PCT (pg/ml)	<b>1518 (1277-3690)</b>	<b>2077 (931-2244)</b>	1021 (284-1402)	<b>698 (656-1395)</b>	439 (343-1206)	331 (318-1020)
	LBP (µg/ml)	13,6 (12-17,7)	20,6 (16,1-24,8)	16,8 (14,2-28,5)	16,1 (13,3-27,9)	20,6 (15,4-49)	21,8 (15,6-32,3)
	total-IL-8 (pg/ml)	<b>345 (258-498)</b>	<b>363 (303-469)</b>	<b>252 (177-370)</b>	<b>223 (161-386)</b>	<b>404 (311-459)</b>	427 (351-488)
	CRP (mg/dl)	6,6 (6,2-7,1)					
	IL-6 (pg/ml)	38,2 (22,1-54,5)					
	<i>ex vivo</i> Elastase (ng/ml)	203 (147-248)	203 (164-273)				
	<i>ex vivo</i> TNF-α (pg/ml)	224 (212-249)	<b>234 (207-279)</b>	<b>259 (136-311)</b>	282 (185-473)	197 (111-208)	158 (115-277)
	Neuinfektionen	n=9 3	n=9 2	n=9 1	n=8 0	n=6 1	n=6 2



Tabelle 5: Mediane (sowie 25%- und 75%-Perzentile) der Oberflächenexpressionen in den 3 Patientengruppen. In den Infektionsgruppen (Gruppen B und C) sind signifikant unterschiedliche Werte im Vergleich zur Gruppe A fett dargestellt.

		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
		n=33	n=33	n=33	n=16	n=4	n=1
Gruppe A (keine Infektion)	auf Monozyten						
	HLA-DR (AK/Zelle)	6092 (5451-7259)	5144 (3892-6118)	6348 (4913-8033)	7132 (4867-10524)	8245 (5898-11560)	7235
	CD86 (AK/Zelle)	2019 (1840-2311)	2022 (1762-2332)	2260 (2045-2581)	2171 (1777-2448)	2490 (2147-2524)	2024
	CD71 (AK/Zelle)	2035 (1874-2147)	1881 (1698-2073)	2130 (1887-2379)	1896 (1676-2146)	1727 (1703-1853)	1855
	CD64 (AK/Zelle)	21468 (19078-23206)	19943 (17104-24103)	20297 (17110-22557)	19019 (15940-21630)	19030 (19015-19068)	20078
	CD11b (AK/Zelle)	15630 (11951-18490)	15681 (11261-19866)	16948 (15430-22360)	19078 (12017-24918)	22307 (18376-25454)	11388
	auf Neutrophilen						
	CD64 (AK/Zelle)	1131 (908-1590)	1612 (1184-2350)	1415 (1133-1949)	903 (747-1388)	775 (626-854)	998
	CD11b (AK/Zelle)	6244 (4730-7650)	5238 (4118-6056)	5217 (4430-7191)	6785 (4942-7855)	5742 (4999-6344)	5767
	Gruppe B (vermutete Infektion)	Neuinfektionen	n=14 3	n=14 6	n=14 4	n=12 1	n=9 0
auf Monozyten							
HLA-DR (AK/Zelle)		4164 (3713-6703)	3529 (3108-4635)	4120 (3072-5281)	4557 (3542-8642)	4716 (2635-6525)	6568 (5603-8318)
CD86 (AK/Zelle)		1921 (1809-2264)	1930 (1818-2174)	2015 (1947-2177)	2028 (1870-2326)	1909 (1683-2296)	2191 (2014-2787)
CD71 (AK/Zelle)		1921 (1650-2744)	1989 (1902-2174)	2245 (2032-2414)	2187 (1927-2407)	1862 (1637-1919)	2052 (1990-2550)
CD64 (AK/Zelle)		20748 (18838-22598)	21410 (17678-24096)	16821 (15255-22922)	21126 (15265-24952)	22610 (16375-23148)	23294 (13517-27921)
CD11b (AK/Zelle)		19236 (14546-20135)	16333 (14373-18316)	17078 (10956-19043)	17089 (13406-21689)	15440 (11908-17755)	21998 (14890-26745)
auf Neutrophilen							
CD64 (AK/Zelle)		1334 (916-1917)	2462 (1322-2730)	1911 (1238-2609)	1407 (1254-2998)	1179 (1002-2464)	1208 (825-1459)
CD11b (AK/Zelle)		5720 (4910-6898)	4873 (4280-5982)	5427 (3729-5931)	4954 (4581-5970)	5488 (4768-7460)	7261 (5485-8502)
Gruppe C (mikrobiell bestätigte Infektion)	Neuinfektionen	n=9 3	n=9 2	n=9 1	n=8 0	n=6 1	n=6 2
	auf Monozyten						
	HLA-DR (AK/Zelle)	4718 (3576-5309)	3489 (2363-6361)	3449 (3011-5111)	5786 (3354-6836)	3788 (2724-4645)	3412 (2724-5403)
	CD86 (AK/Zelle)	1915 (1800-2040)	1799 (1704-2038)	2020 (1933-2132)	2208 (2049-2226)	2017 (1857-2059)	2057 (1876-2137)
	CD71 (AK/Zelle)	2213 (1836-2223)	2054 (1901-2365)	2247 (2041-2689)	2120 (2042-2284)	2229 (2045-2721)	1975 (1900-2109)
	CD64 (AK/Zelle)	24247 (22990-25263)	20342 (19122-22880)	21468 (15651-22860)	18744 (16769-22588)	20168 (18409-22511)	20971 (19156-21996)
	CD11b (AK/Zelle)	14458 (11653-15507)	14152 (11097-15021)	15984 (14498-19129)	15414 (13069-20479)	15126 (12174-15514)	12313 (11077-14548)
	auf Neutrophilen						
	CD64 (AK/Zelle)	1339 (911-1694)	2222 (1351-2818)	2152 (1920-2856)	1653 (1106-2160)	1470 (865-2007)	1759 (1355-1954)
	CD11b (AK/Zelle)	6325 (5125-6784)	5339 (4521-6568)	5129 (4319-7465)	7067 (5279-7890)	7521 (6418-9493)	8520 (6555-8600)

*Tabelle 6:* Mediane (sowie 25%- und 75%-Perzentile) der leukozytären mRNA-Expressionen am Tag 1 in den 3 Patientengruppen, sowie bei 8 Probanden (jeweils normalisiert auf HPRT). Diejenigen Probandenwerte, die sich signifikant von den Patientenwerten unterschieden, sind fett dargestellt.

	<b>Gruppe A</b> (keine Infektion)	<b>Gruppe B</b> (vermutete Infektion)	<b>Gruppe C</b> (mikrobiell bestätigte Infektion)	<b>gesunde Probanden</b>
	n=24	n=13	n=4	n=8
IL-8 ( $2^{-\Delta C(T)}$ )	0,07 (0,03-0,11)	0,11 (0,06-0,18)	0,11 (0,06-0,15)	<b>0,47 (0,21-0,96)</b>
IL-10 ( $2^{-\Delta C(T)}$ )	0,03 (0,02-0,05)	0,04 (0,02-0,05)	0,06 (0,04-0,13)	<b>0 (0-0,01)</b>
SOCS-3 ( $2^{-\Delta C(T)}$ )	0,87 (0,28-1,98)	0,36 (0,26-1,62)	1,64 (1,11-2,02)	<b>0,23 (0,13-0,39)</b>
Rantes ( $2^{-\Delta C(T)}$ )	6,8 (4,0-12,1)	4,4 (2,9-6,7)	3,14 (2,27-4,72)	<b>31,9 (24,0-38,2)</b>
HO-1 ( $2^{-\Delta C(T)}$ )	1,53 (1,13-2,74)	1,51 (1,03-2,99)	3,08 (2,11-6,56)	1,09 (0,95-1,71)
TNF- $\alpha$ ( $2^{-\Delta C(T)}$ )	0,33 (0,20-0,56)	0,34 (0,22-0,45)	0,4 (0,24-0,59)	0,60 (0,31-1,07)

### 4.3 Untersuchung des gesamten Patientenkollektivs bezüglich Immunaktivierung / Immundeaktivierung

#### 4.3.1 Erhöhung von Immunaktivierungsmarkern in allen Patientengruppen

Alle Patientengruppen zeigten postoperativ vor allem am ersten Tag eine allgemeine Immunaktivierung, erkennbar an erhöhten Werten für total-IL-8, LBP (*Abbildung 9* und *Abbildung 10*), CRP und IL-6 (Daten nicht dargestellt), im Vergleich zu Referenzwerten des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité (CCM). Im Gegensatz zu den erhöhten total-IL-8-Spiegeln zeigten die Studienpatienten gegenüber gesunden Probanden eine signifikant erniedrigte leukozytäre IL-8-mRNA-Expression (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ , *Abbildung 11*). Außerdem fand eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten statt, was sich aus den erhöhten Werten der *ex vivo* Elastase-Sekretion im Vergleich zu 10 präoperativen Patienten (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ , *Abbildung 12*) und der CD64-Expression auf Neutrophilen (Daten nicht dargestellt) im Vergleich zu Referenzwerten ergibt. Die leukozytäre mRNA-Expression von Rantes war im Vergleich zu gesunden Probanden stark erniedrigt (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ , *Abbildung 13*). Die leukozytäre TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen Patienten und Probanden (Daten nicht dargestellt).

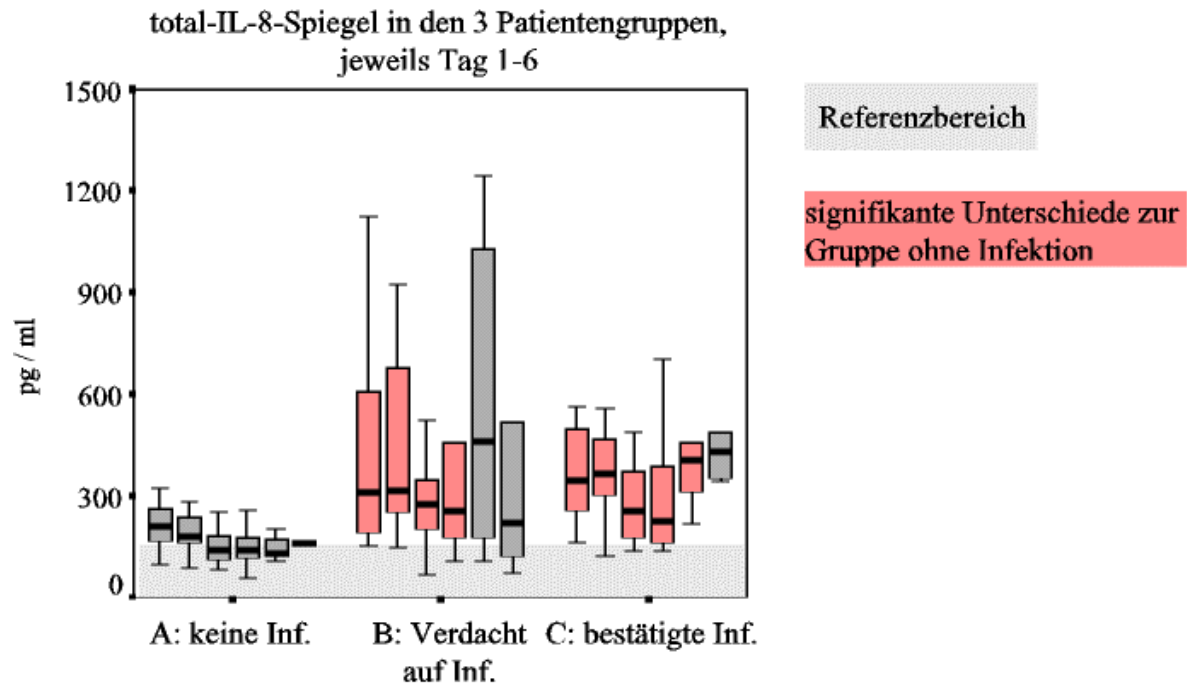


Abbildung 9: Erhöhte total-IL-8-Spiegel (nach Erythrozytenlyse) in allen Patientengruppen, vor allem am ersten postoperativen Tag, gegenüber Referenzwerten. Verglichen mit der Patientengruppe ohne Infektion ergaben sich signifikant erhöhte Werte für Patienten mit Verdacht auf Infektion an den Tagen 1-4, sowie für Patienten mit bestätigter Infektion an den Tagen 1-5 (Kruskal-Wallis, Tage 1, 4 und 5  $p < 0,05$ , Tage 2 und 3  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney, Gruppe B versus A Tag 1  $p < 0,05$ , Tage 2 bis 4  $p < 0,01$ , Gruppe C versus A Tage 1 und 4  $p < 0,05$ , Tage 2, 3 und 5  $p < 0,01$ ).

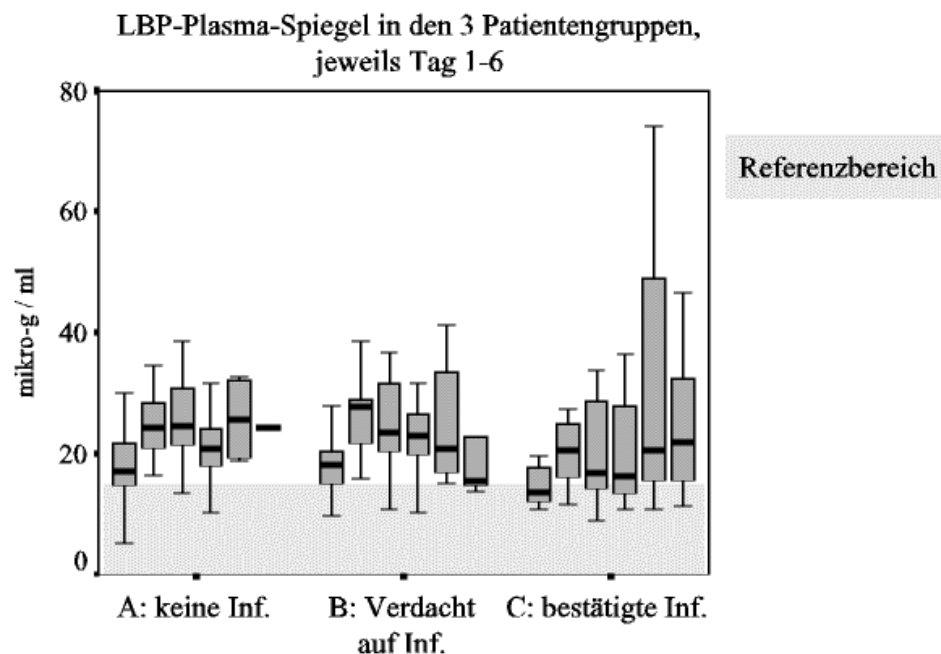


Abbildung 10: Gleichmaßen erhöhte LBP-Plasma-Spiegel in allen Patientengruppen im Vergleich zum Referenzbereich, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

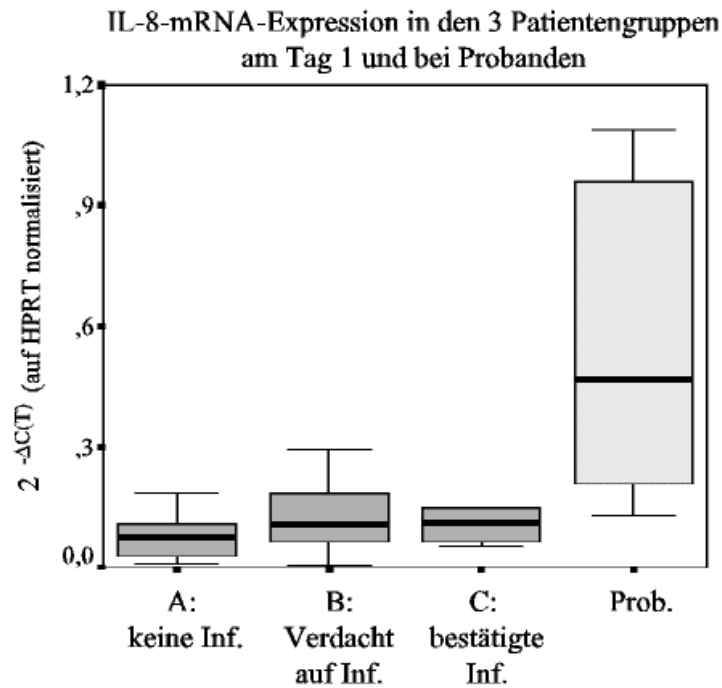


Abbildung 11: Verminderte leukozytäre IL-8-mRNA-Expression aller drei Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Probanden (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen bestanden nicht.

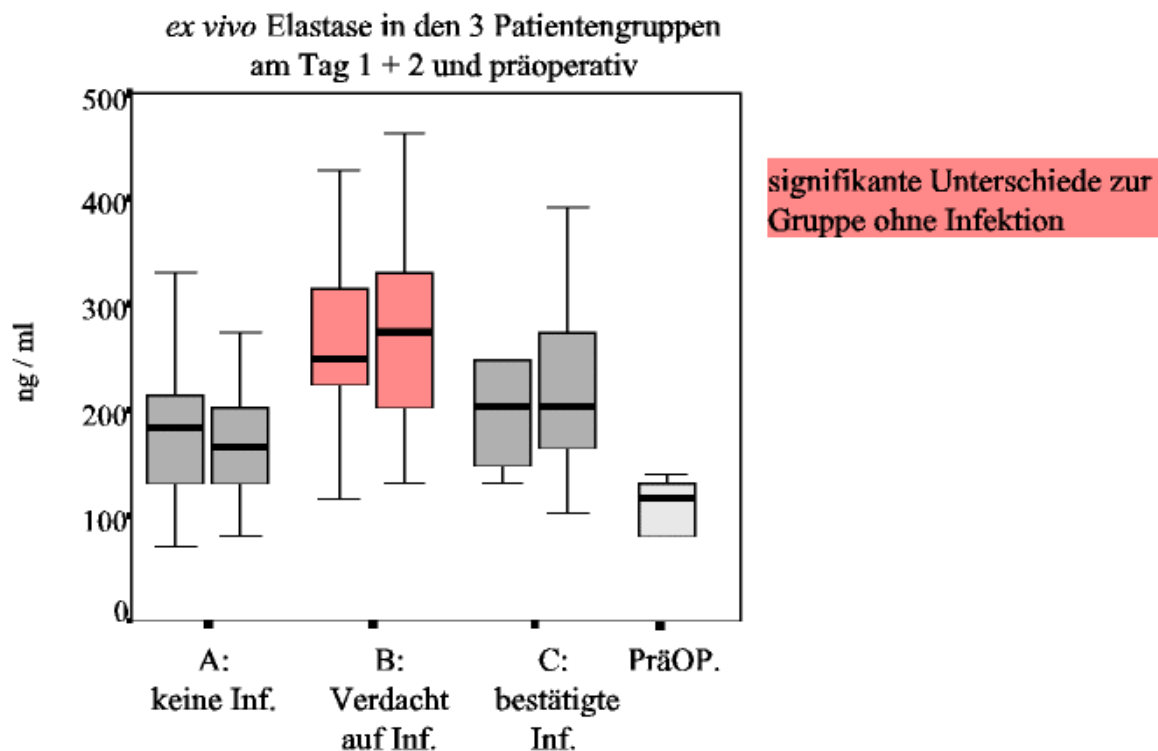


Abbildung 12: Signifikant erhöhte *ex vivo* Elastase-Produktion in allen Patientengruppen im Vergleich zu 10 präoperativen Patienten (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ). Patienten mit Verdacht auf Infektion (nicht dagegen Patienten mit bestätigter Infektion) zeigten signifikant erhöhte Werte an beiden gemessenen Tagen im Vergleich zu Patienten ohne Infektion (Kruskal-Wallis, Tag 1  $p < 0,05$ , Tag 2  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney, Gruppe B versus A Tage 1 und 2  $p < 0,01$ ).

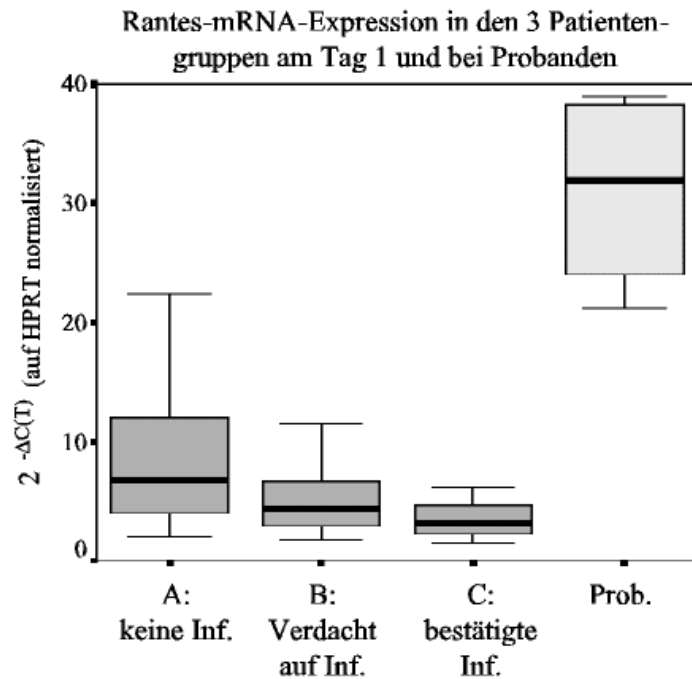


Abbildung 13: Stark erniedrigte leukozytäre Rantes-mRNA-Expression aller drei Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Probanden (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

#### 4.3.2 Immundeaktivierung / Immundepression in allen Patientengruppen

Als Zeichen für eine Immundepression waren in allen drei Patientengruppen die monozytären Expressionen von HLA-DR und CD86 erniedrigt (Abbildung 14 und Abbildung 15), sowie die *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Sekretion (Daten nicht dargestellt), jeweils im Vergleich zu Referenzwerten des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité (CCM). Ebenso waren auch die IL-10-Plasma-Werte in vielen Proben aller drei Patientengruppen erhöht, was aber aufgrund der unteren Nachweisgrenze von 5 pg/ml statistisch nicht signifikant war (Abbildung 16). Die Messung der leukozytären IL-10-mRNA-Expression ergab prinzipiell ein Bild ähnlich dem der IL-10-Plasma-Spiegel (Abbildung 17), mit signifikant erhöhten Werten aller Patienten gegenüber den gesunden Probanden (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ). Damit einhergehend war in allen Patientengruppen die mRNA-Expression von SOCS-3 erhöht (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ , Abbildung 18), während die HO-1-mRNA-Expression keine Unterschiede zeigte (Daten nicht dargestellt).

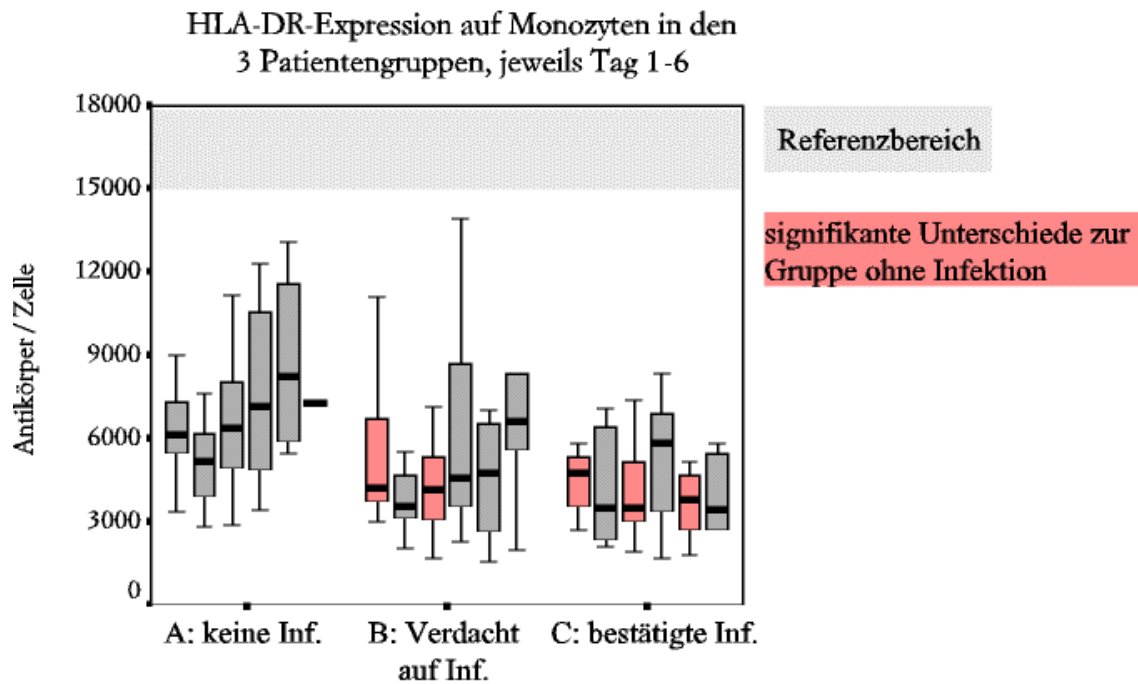


Abbildung 14: Erniedrigte monozytäre HLA-DR-Expression in allen Patientengruppen verglichen mit Referenzwerten. Im Vergleich zu Patienten ohne Infektion zeigten Patienten mit Verdacht auf Infektion signifikant erniedrigte Werte an den Tagen 1 und 3, Patienten mit bestätigter Infektion zusätzlich am Tag 5 (Kruskal-Wallis, Tage 1 und 3  $p < 0,01$ , Tag 5  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney, Gruppe B versus A Tag 1  $p < 0,05$ , Tag 3  $p < 0,01$ , Gruppe C versus A Tage 1, 3 und 5  $p < 0,01$ ).

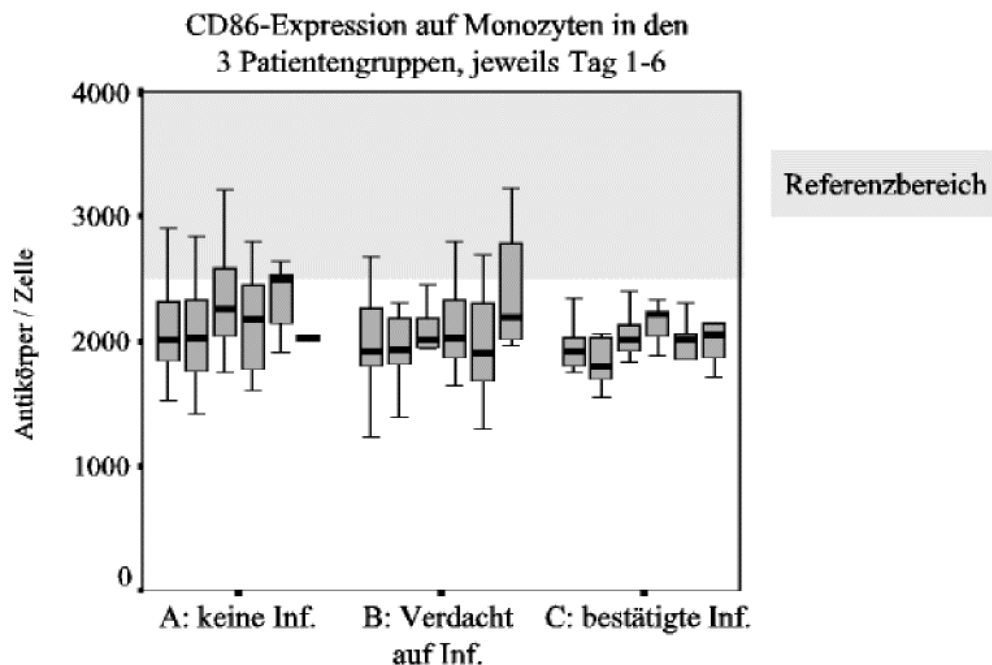


Abbildung 15: Erniedrigte monozytäre CD86-Expression in allen Patientengruppen im Vergleich zu Referenzwerten. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

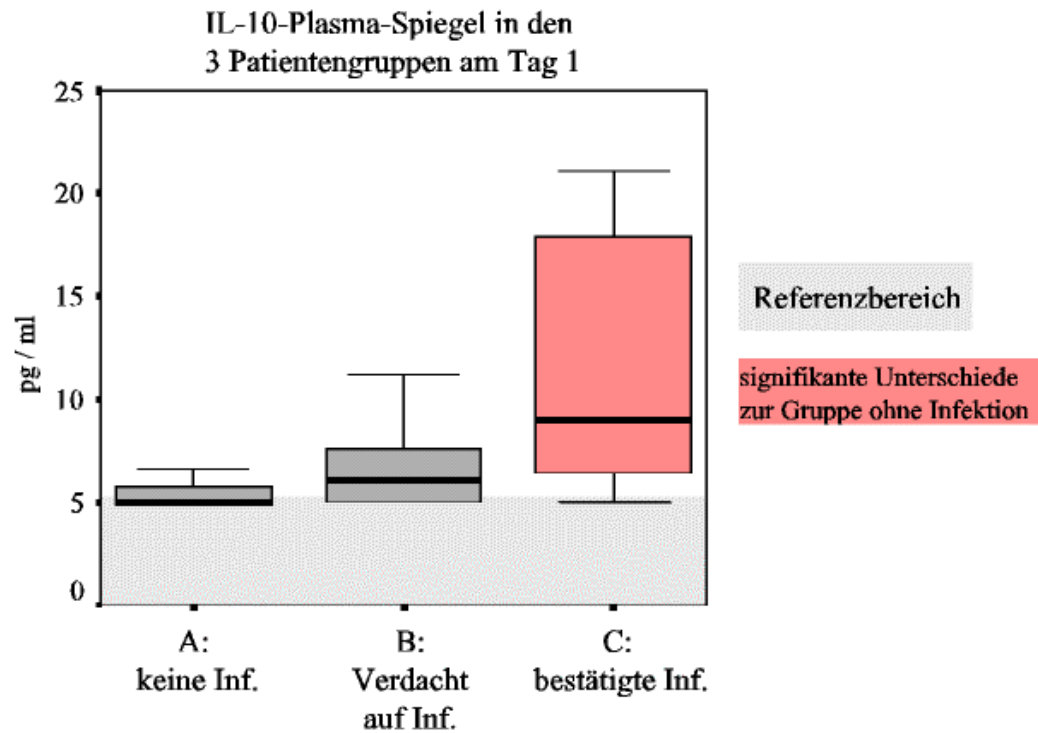


Abbildung 16: Erhöhte IL-10-Plasma-Werte bei Patienten mit bestätigter Infektion im Vergleich zur Patientengruppe ohne Infektion (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Inwieweit auch die Gruppe ohne Infektion über dem Referenzlimit lag, lässt sich aufgrund der unteren Nachweisgrenze von 5 pg/ml nicht eindeutig sagen.

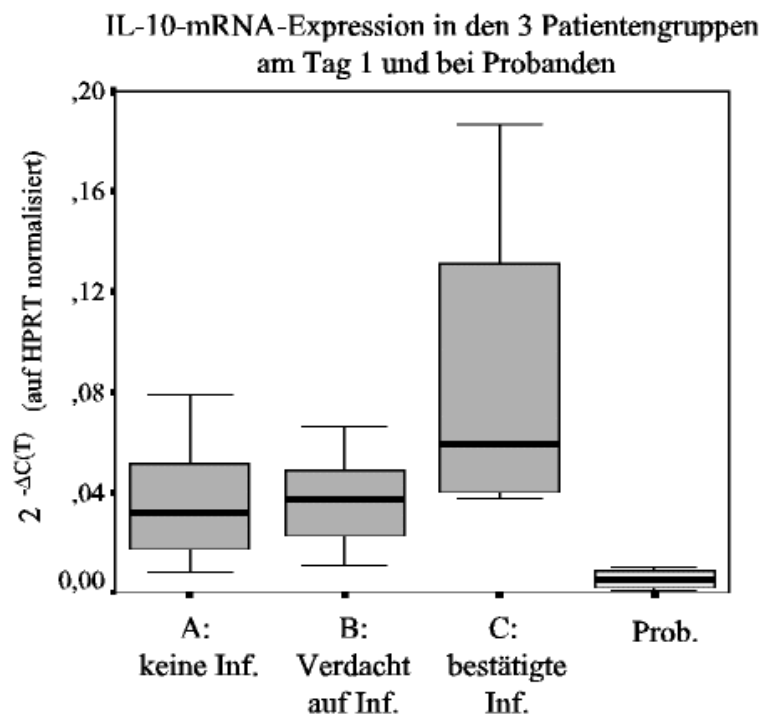


Abbildung 17: Erhöhte leukozytäre IL-10-mRNA-Expression aller drei Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Probanden (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ). Die Patientengruppe mit bestätigter Infektion zeigte tendenziell höhere Werte als Patienten ohne Infektion, jedoch ohne statistische Signifikanz.

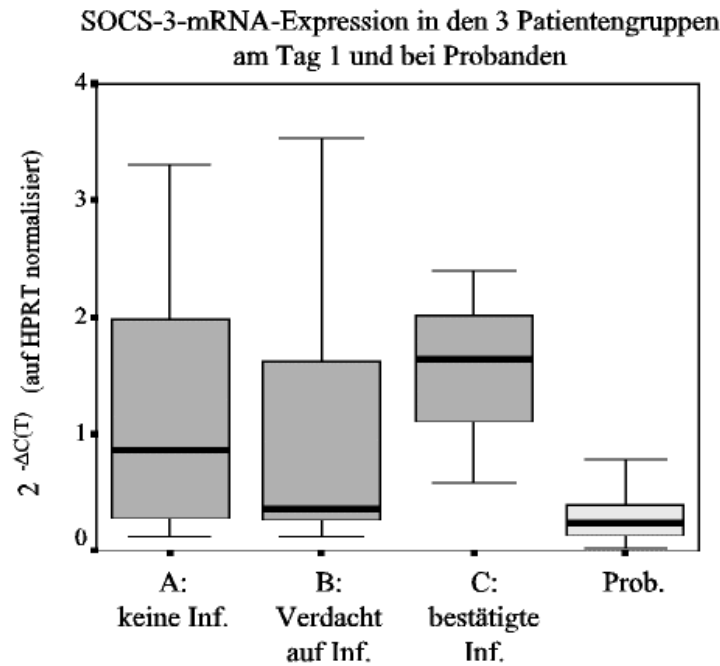


Abbildung 18: Erhöhte leukozytäre SOCS-3-mRNA-Expression aller drei Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Probanden (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

#### 4.4 Paraklinische Patientengruppen: Immunaktivierung und HLA-DR-Erhholung

Eine Korrelationsanalyse zwischen den Immunaktivierungsmarkern total-IL-8 und PCT und dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 im Plasma am Tag 1 auf der einen Seite und der monozytären HLA-DR-Expression im 6-tägigen postoperativen Verlauf auf der anderen Seite zeigte grundsätzlich eine inverse, wenn auch schwache Korrelation zwischen den genannten Markern und HLA-DR. Signifikante inverse Korrelationen ergaben sich zwischen total-IL-8 am Tag 1 und HLA-DR während des gesamten 6-tägigen Beobachtungszeitraumes. PCT am Tag 1 korrelierte mit HLA-DR an den Tagen 2, 3 und 5, Plasma-IL-10 an den Tagen 2 und 3. Es errechnete sich beispielsweise für Plasma-IL-10 am Tag 1 und der HLA-DR-Expression an den Tagen 2 und 3 ein Korrelationskoeffizient nach Spearman von  $-0,4$ , für total-IL-8 am Tag 1 und HLA-DR an den Tagen 2 und 3 von unter  $-0,5$ , jeweils für  $p < 0,01$ . In *Tabelle 7* sind diesbezüglich alle signifikanten Korrelationen und ihre Koeffizienten zusammengestellt.



Tabelle 7: Signifikante Korrelationen zwischen Tag 1-Werten von total-IL-8, PCT und Plasma-IL-10 und der monozytären HLA-DR-Expression an den Tagen 1-6.

	HLA-DR auf Monozyten					
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
<i>Korrelationskoeffizient nach Spearman</i>						
total-IL-8 Tag 1	k= -0,35*	k= -0,53**	k= -0,54**	k= -0,39*	k= -0,75**	k= -0,67*
PCT Tag 1	/	k= -0,36*	k= -0,35**	/	k= -0,62**	/
Plasma-IL-10 Tag 1	/	k= -0,40**	k= -0,41**	/	/	/

\*p<0,05

\*\*p<0,01

Diesen Ergebnissen entsprechen die Auswertungen der paraklinischen Immunaktivierungsgruppen, die auf der Grundlage der Über- / Unterschreitung von Schwellenwerten in den Immunmarkern total-IL-8, PCT und Plasma-IL-10 am Tag 1 (siehe Kapitel 4.6.1) gebildet wurden. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit einer ausgeprägten Aktivierung des Immunsystems am Tag 1 eine verzögerte „Erholung“ der Immunkompetenz stattfand. Patienten mit erhöhten total-IL-8- und PCT-Plasma-Spiegeln am Tag 1 (>322 beziehungsweise >650 pg/ml) zeigten einen signifikant niedrigeren Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression während der 6-tägigen postoperativen Beobachtungsdauer (nonparametrische Varianzanalyse, p<0,01 für total-IL-8, beziehungsweise p<0,05 für PCT, *Abbildung 19* und *Abbildung 20*). In ähnlicher Weise beeinflussten erhöhte Plasmawerte von IL-10 am Tag 1 den postoperativen Verlauf der HLA-DR-Expression; erhöhte IL-10-Werte gingen mit einem signifikant niedrigerem HLA-DR-Verlauf einher (nonparametrische Varianzanalyse, p<0,05, *Abbildung 21*).

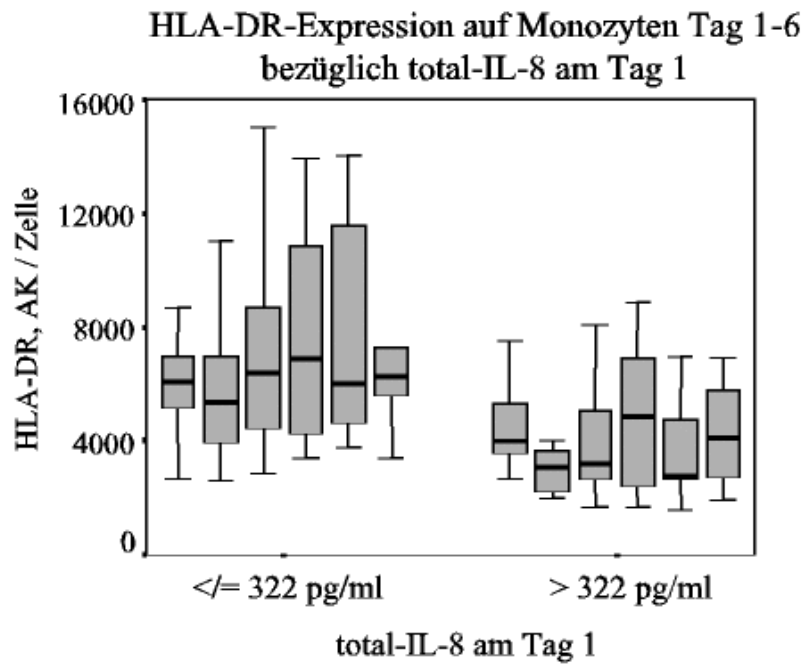


Abbildung 19: Signifikant niedrigere HLA-DR-Expression im 6-tägigen postoperativen Verlauf bei erhöhten total-IL-8-Spiegeln am Tag 1 (nonparametrische Varianzanalyse,  $p < 0,01$ ).

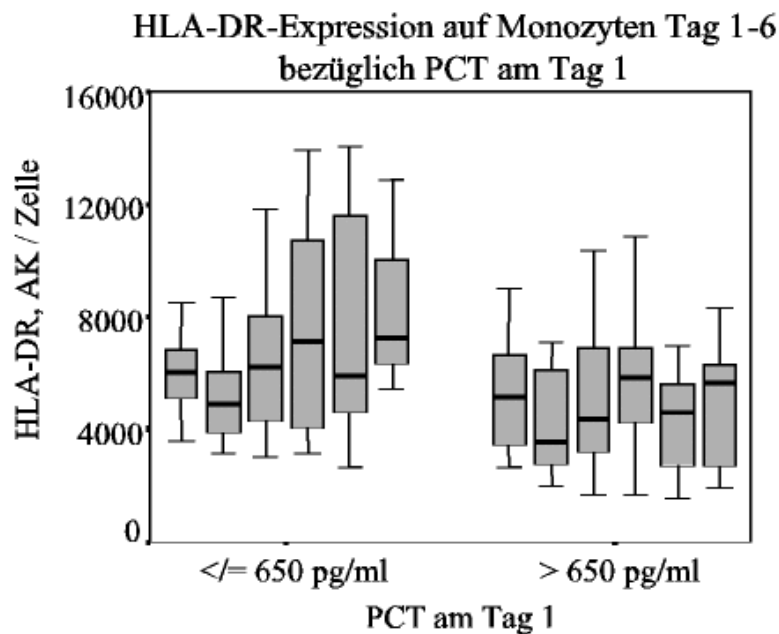


Abbildung 20: Signifikant niedrigere HLA-DR-Expression im 6-tägigen postoperativen Verlauf bei erhöhten PCT-Werten am Tag 1 (nonparametrische Varianzanalyse,  $p < 0,05$ ).

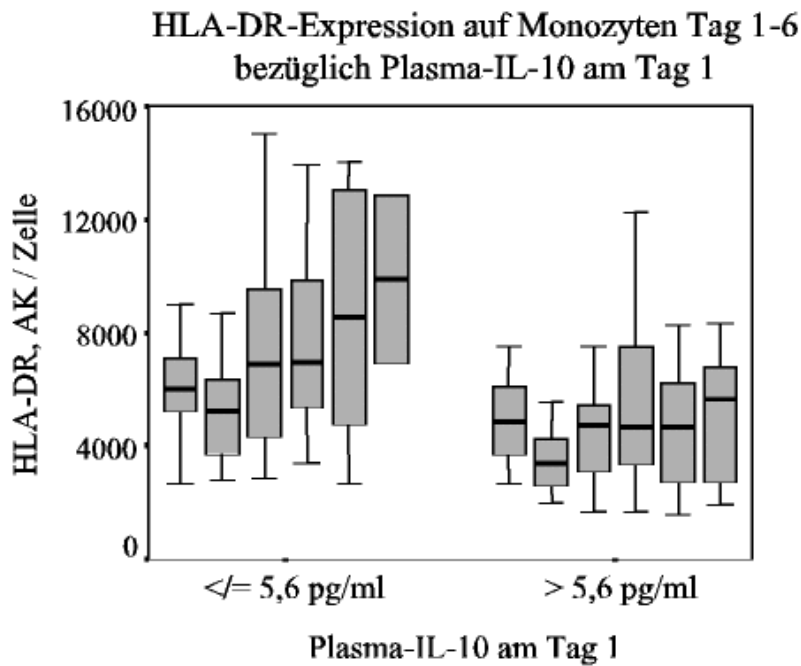


Abbildung 21: Signifikant niedrigere HLA-DR-Expression im 6-tägigen postoperativen Verlauf bei erhöhten Plasma-IL-10-Spiegeln am Tag 1 (nonparametrische Varianzanalyse,  $p < 0,05$ ).

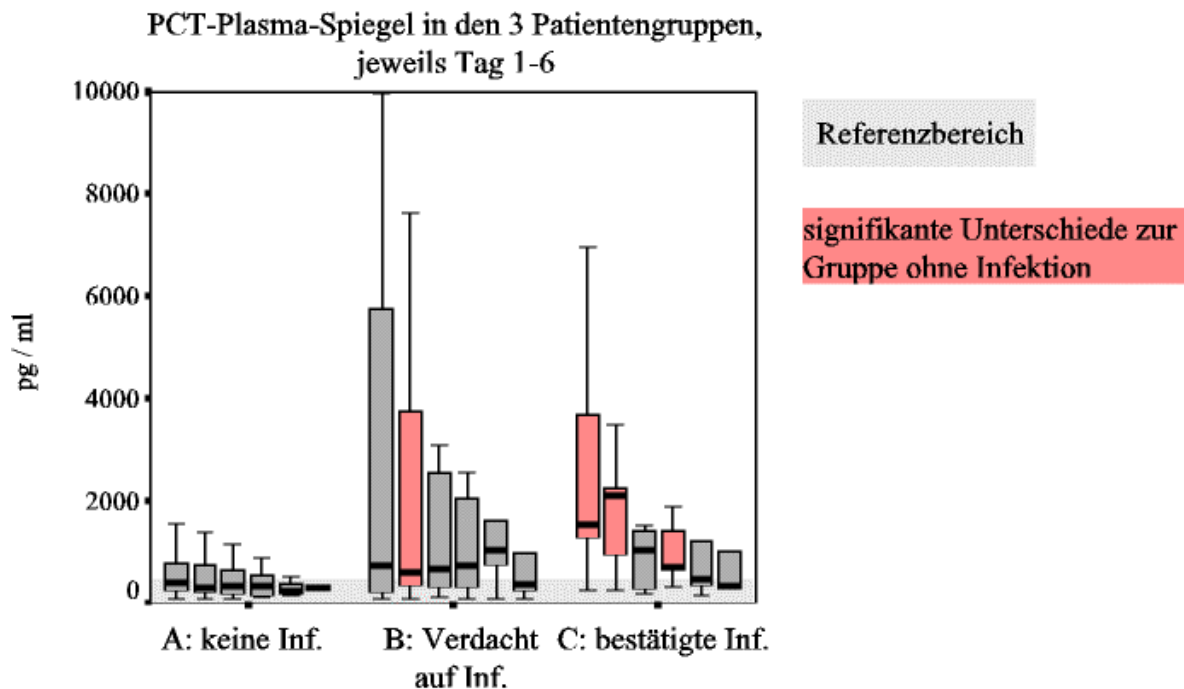
## 4.5 Differenzierte Untersuchung der verschiedenen klinischen Patientengruppen

### 4.5.1 Immunaktivierung bei Patienten mit postoperativer Infektion

Patienten mit Infektion zeigten generell eine stärkere Immunaktivierung. Unter den entsprechenden Markern fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen (Patienten ohne Infektion (A), Patienten mit Verdacht auf Infektion (B), Patienten mit bestätigter Infektion (C)) für total-IL-8, PCT, *ex vivo* Elastase und CD64-Expression auf Neutrophilen (Kruskal-Wallis; total-IL-8 Tage 1, 4 und 5  $p < 0,05$ , Tage 2 und 3  $p < 0,01$ , PCT Tage 1, 2 und 4  $p < 0,05$ , *ex vivo* Elastase Tag 1  $p < 0,05$ , Tag 2  $p < 0,01$ , CD64 auf Neutrophilen Tage 4 und 5  $p < 0,05$ ).

In den Gruppen B und C im Vergleich zur Gruppe ohne Infektion zeigten sich signifikant erhöhte total-IL-8-Werte an den Tagen 1 bis 4, in der Gruppe mit bestätigter Infektion zusätzlich am Tag 5 (Mann-Whitney, Gruppe B versus A Tag 1  $p < 0,05$ , Tage 2 bis 4  $p < 0,01$ , Gruppe C versus A Tage 1 und 4  $p < 0,05$ , Tage 2, 3 und 5  $p < 0,01$ , Abbildung 9). PCT-Plasma-Spiegel waren in der Gruppe mit bestätigter Infektion an den Tagen 1, 2 und 4, in der Gruppe mit Verdacht auf Infektion am Tag 2 signifikant erhöht gegenüber der Patientengruppe ohne

Infektion (Mann-Whitney, Gruppe C versus A Tag 1  $p < 0,05$ , Tage 2 und 4  $p < 0,01$ , Gruppe B versus A Tag 2  $p < 0,05$ , *Abbildung 22*).



*Abbildung 22:* Erhöhte PCT-Plasma-Spiegel in den Patientengruppen mit Infektion (Gruppen B und C) im Vergleich zu Referenzwerten. Verglichen mit der Patientengruppe ohne Infektion ergaben sich signifikant erhöhte Werte sowohl für Patienten mit Verdacht auf Infektion (Tag 2), als auch für Patienten mit bestätigter Infektion (Tage 1, 2 und 4) (Kruskal-Wallis, Tage 1, 2 und 4  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney, Gruppe C versus A Tag 1  $p < 0,05$ , Tage 2 und 4  $p < 0,01$ , Gruppe B versus A Tag 2  $p < 0,05$ ).

Die *ex vivo* Elastase-Produktion war in der Gruppe mit vermuteter Infektion an beiden gemessenen Tagen gegenüber der Gruppe ohne Infektion signifikant erhöht, während die Gruppe mit bestätigter Infektion keine erhöhten Werte zeigte (Mann-Whitney, Gruppe B versus A Tage 1 und 2  $p < 0,01$ , *Abbildung 12*). Die höhere neutrophile Aktivierung unter den Patienten mit Infektion wurde sowohl durch die genannten Elastase-Ergebnisse als auch durch eine signifikant erhöhte Expression von CD64 am Tag 5 (Gruppe C) beziehungsweise an den Tagen 4 und 5 (Gruppe B) widerspiegelt (Mann-Whitney, jeweils für  $p < 0,05$ , Daten nicht dargestellt).

Währenddessen war LBP an allen sechs gemessenen Tagen (*Abbildung 10*) sowie IL-6 und CRP am Tag 1 (nicht dargestellt) in allen drei Patientengruppen ohne signifikante Gruppenunterschiede gleichermaßen erhöht. Auch ergaben die Expressionen von CD71, CD64 und CD11b auf Monozyten sowie von CD11b auf Neutrophilen keine signifikanten Gruppenunterschiede (nicht dargestellt), ebenso wie die leukozytären mRNA-Expressionen von IL-8 (*Abbildung 11*), Rantes (*Abbildung 13*) und TNF- $\alpha$  (nicht dargestellt).

#### 4.5.2 Immundeaktivierung bei Patienten mit postoperativer Infektion

Des weiteren zeigten Patienten mit Infektion im Vergleich zu der Patientengruppe ohne Infektion eine ausgeprägtere Depression des Immunsystems. Signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen ergaben sich für die monozytäre HLA-DR-Expression, die *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktion und das Plasma-IL-10 (Kruskal-Wallis; HLA-DR Tage 1 und 3  $p < 0,01$ , Tag 5  $p < 0,05$ , *ex vivo* TNF- $\alpha$  Tage 2 und 3  $p < 0,01$ , IL-10 Tag 1  $p < 0,05$ ). Für die HLA-DR-Expression ergaben sich an den Tagen 1 und 3 (Gruppe B) beziehungsweise 1, 3 und 5 (Gruppe C) signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Patientengruppe ohne Infektion (Mann-Whitney, Gruppe B versus Gruppe A Tag 1  $p < 0,05$ , Tag 3  $p < 0,01$ , Gruppe C versus A Tage 1, 3 und 5  $p < 0,01$ , *Abbildung 14*). Die *ex vivo* TNF- $\alpha$  Produktion war an den Tagen 2 und 3 in der Gruppe mit bestätigter Infektion signifikant erniedrigt (Mann-Whitney,  $p < 0,01$ , Daten nicht dargestellt), während CD86 keinerlei Gruppenunterschiede aufwies (*Abbildung 15*). IL-10-Plasma-Spiegel am Tag 1 waren in der Gruppe mit bestätigter Infektion signifikant erhöht (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ , *Abbildung 16*). Auf mRNA-Ebene zeigte sich ein ähnliches Bild mit einer Tendenz zu höheren Werten in der Gruppe mit bestätigter Infektion (*Abbildung 17*), allerdings erreichten diese keine statistische Signifikanz, vermutlich weil die Fallzahl der mRNA-Bestimmungen zu gering war (siehe Kapitel 3.3). Auch die mRNA-Expression von SOCS-3 ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede (*Abbildung 18*), sowie die mRNA-Expression von HO-1 (nicht dargestellt).

### 4.6 ROC-Analysen

#### 4.6.1 Marker bezüglich postoperativer Infektion (Gruppe B und C)

Um Marker zu erhalten, die zwischen Patienten ohne und jenen Patienten mit Infektion im 6-tägigen postoperativen Verlauf (sowohl Gruppe B als auch C) möglichst frühzeitig (am Tag 1 postoperativ) diskriminieren können, wurden Analysen auf der Grundlage von Receiver Operating Characteristics (ROC)- Kurven durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass am Tag 1 das monozytäre HLA-DR der Marker mit dem größten Diskriminierungspotenzial war, mit einer Fläche unter der ROC-Kurve ( $AUC^1$ ) von 0,75 (95%-Konfidenz-Intervall (CI) von 0,62 bis 0,86 für  $p < 0,01$ ). Die AUC von Plasma-IL-10 betrug 0,68 (95%-CI von 0,53 - 0,80 für  $p < 0,05$ ) (*Abbildung 23*). Die Immunaktivierungsmarker inklusive der *ex vivo* Elastase zeigten zum Teil

---

<sup>1</sup> Area under the Curve

ebenfalls ein gutes Diskriminierungspotenzial. Total-IL-8 und PCT am Tag 1 kamen auf eine AUC von 0,73 beziehungsweise 0,68 (95%-CI von 0,57 bis 0,88 beziehungsweise 0,52 bis 0,85 für  $p < 0,01$  beziehungsweise  $p < 0,05$ ), *ex vivo* Elastase erreichte 0,72 (95%-CI von 0,58-0,84 für  $p < 0,01$ ) (Abbildung 24).

Dagegen konnten konventionelle Infektionszeichen und –marker entweder nicht signifikant zwischen Patienten mit versus ohne Infektion unterscheiden (CRP, mit einem 95%-CI von 0,42-0,73, Abbildung 25), beziehungsweise ergaben mindestens 2 positive SIRS-Kriterien am Tag 1 nur eine AUC von 0,66 (95%-CI von 0,52-0,81 für  $p < 0,05$ , nicht dargestellt).

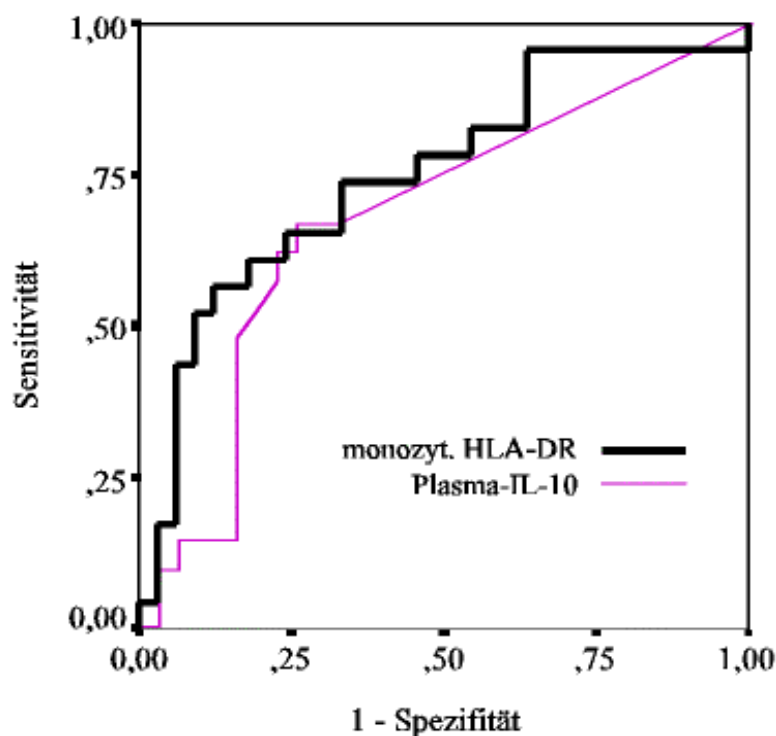


Abbildung 23: ROC-Kurven der Tag 1-Werte von monozytärem HLA-DR und Plasma-IL-10 bezüglich des Auftretens einer Infektion (vermutet (Gruppe B) oder bestätigt (Gruppe C)) im postoperativen Verlauf. Die AUC von HLA-DR war mit 0,75 unter allen gemessenen Markern am höchsten. Plasma-IL-10 erreichte eine AUC von 0,68.

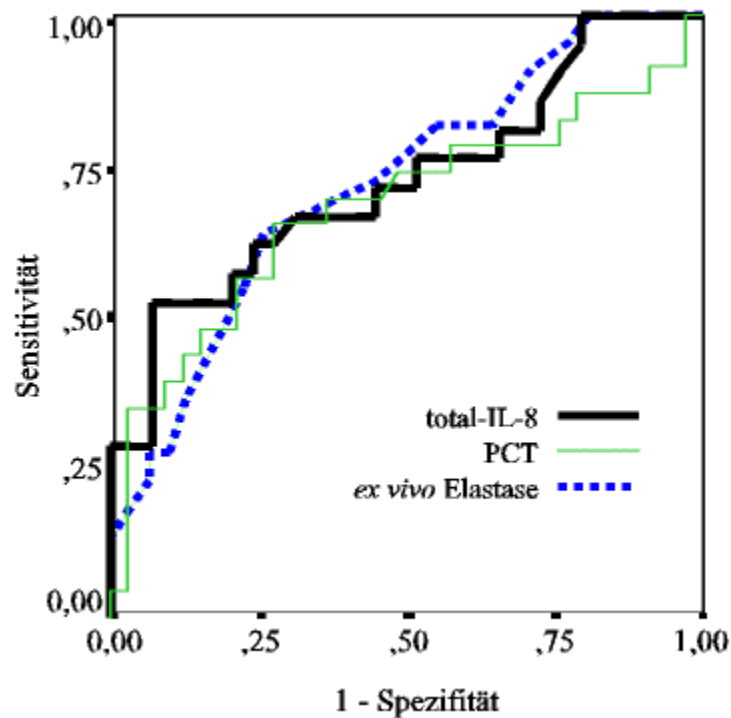


Abbildung 24: ROC-Kurven der Tag 1-Werte von Immunaktivierungsmarkern bezüglich des Auftretens einer Infektion (vermutet (Gruppe B) oder bestätigt (Gruppe C)) im postoperativen Verlauf. Die AUCs betrugen 0,73 für total-IL-8, 0,68 für PCT und 0,72 für *ex vivo* Elastase.

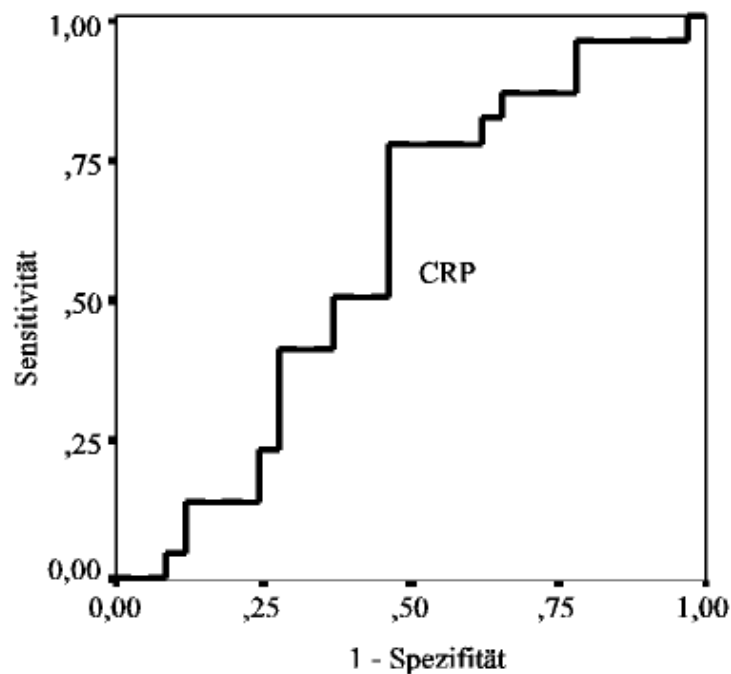


Abbildung 25: ROC-Kurve der Tag 1-Werte von CRP bezüglich des Auftretens einer Infektion (vermutet (Gruppe B) oder bestätigt (Gruppe C)) im postoperativen Verlauf. Die AUC lag lediglich bei 0,58 und war aufgrund des asymptotischen Konfidenzintervalls von 0,42-0,73 nicht signifikant für  $p < 0,05$ .

Mit Hilfe der ROC-Kurven wurden Schwellenwerte der Marker am Tag 1 ermittelt, die eine optimale Kombination von Sensitivität und Spezifität für das Auftreten von Infektion während der 6-tägigen Beobachtungsdauer ergaben. Eine monozytäre HLA-DR-Expression von 4718 AK- (Antikörper-) Bindungsstellen /Zelle als bester Einzelmarker zeigte eine Sensitivität von 0,57 und eine Spezifität von 0,88. Ein total-IL-8-Cutoff von 322 pg/ml erreichte ähnliche Werte. Besonders hohe Spezifität erreichte die Kombination von HLA-DR und total-IL-8: alle Patienten, die am Tag 1 sowohl eine erniedrigte monozytäre HLA-DR-Expression <4718 AK/Monozyt, als auch erhöhte total-IL-8-Plasmaspiegel >322 pg/ml aufwiesen (n=8), waren als Patienten mit (bestätigter oder vermuteter) Infektion eingestuft worden. Auf dieser Basis wurden außerdem die positiv und negativ prädiktiven Werte und das relative Risiko für das Überbeziehungsweise Unterschreiten der Schwellenwerte bestimmt. *Tabelle 8* fasst diese Informationen zusammen.

*Tabelle 8:* AUC, Sensitivität (Sens.), Spezifität (Spez.), positiv prädiktiver Wert (PPV), negativ prädiktiver Wert (NPV) und Relatives Risiko (RR) von Markern am Tag 1 bezüglich postoperativer Manifestation von Infektion (vermutet (Gruppe B, n=14) oder bestätigt (Gruppe C, n=9)) im 6-tägigen postoperativen Verlauf. Außerdem sind entsprechende Werte für Markerkombinationen angegeben: für das Überbeziehungsweise Unterschreiten von mindestens 2 Schwellenwerten der 3 Marker HLA-DR auf Monozyten, total-IL-8 und *ex vivo* Elastase, sowie von sowohl HLA-DR UND total-IL-8. Im Vergleich dazu die Darstellung von mindestens 2 positiven SIRS-Kriterien am Tag 1, sowie von CRP.

	AUC (95%-CI)	Schwellenwert	Sens. (95%-CI)	Spez. (95%-CI)	PPV	NPV	RR
<i>Einzelmarker</i>							
HLA-DR auf Monos	0,75 (0,62-0,86)	<4718 AK/Zelle	0,57 (0,34-0,77)	0,88 (0,72-0,97)	0,76	0,74	2,98
Plasma-IL-10	0,68 (0,53-0,80)	>5,6 pg/ml	0,67 (0,43-0,85)	0,74 (0,55-0,88)	0,64	0,77	2,73
total-IL-8	0,73 (0,57-0,88)	>322 pg/ml	0,52 (0,30-0,74)	0,93 (0,77-0,99)	0,85	0,73	3,13
PCT	0,68 (0,52-0,85)	>650 pg/ml	0,65 (0,43-0,84)	0,73 (0,54-0,87)	0,63	0,75	2,5
<i>ex vivo</i> Elastase	0,72 (0,58-0,84)	>203 ng/ml	0,64 (0,41-0,83)	0,74 (0,55-0,88)	0,64	0,74	2,47
<i>Markerkombinationen</i>							
2 von 3en: HLA-DR und/oder total-IL-8 und/oder <i>ex vivo</i> Elastase			0,55 (0,32-0,76)	0,88 (0,71-0,96)	0,75	0,74	2,85
HLA-DR UND total-IL-8			0,38 (0,18-0,62)	1 (0,88-1)	1	0,69	3,23
<i>Routinemarkers</i>							
CRP	0,58 (0,42-0,73)*	(>5,84 mg/dl)					
pos. SIRS-Kriterien	0,66 (0,52-0,81)	mindestens 2	0,83 (0,61-0,95)	0,45 (0,28-0,64)	0,51	0,79	2,44

\*→ kein signifikantes diskriminatives Potenzial von CRP am Tag 1



#### 4.6.2 Marker bezüglich bestätigter postoperativer Infektion (Gruppe C)

Des weiteren wurden ROC-Analysen durchgeführt, die die diskriminative Aussagekraft der Marker eingeschränkt auf die Gruppe mit bestätigter Infektion (nur Gruppe C) untersuchen sollten. Dafür wurde die Patientengruppe mit Verdacht auf Infektion von den Auswertungen ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass HLA-DR auf Monozyten am Tag 1 mit einer AUC von 0,85 (95%-CI von 0,73 bis 0,96 für  $p < 0,01$ ) die höchste diskriminative Aussagekraft erreichte, während Plasma-IL-10 am Tag 1 eine AUC von 0,76 aufwies (95%-CI von 0,55 bis 0,96 für  $p < 0,05$ ). Die Immunaktivierungsmarker total-IL-8 und PCT kamen auf 0,76 (95%-CI von 0,59 bis 0,88 für  $p < 0,05$ ) und 0,77 (95%-CI von 0,62 bis 0,89 für  $p < 0,05$ ). CRP (AUC von 0,55, 95%-CI von 0,34-0,75) und SIRS-Kriterien (AUC von 0,62, 95%-CI von 0,43-0,81) konnten jeweils nicht signifikant zwischen Patienten ohne und jenen mit bestätigter Infektion unterscheiden.

In *Tabelle 9* finden sich Berechnungen zu Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiven Werten und Relativem Risiko bei Über- beziehungsweise Unterschreiten von optimierten Schwellenwerten, die analog zu den obigen Ausführungen mit Hilfe der ROC-Kurven ermittelt wurden.

*Tabelle 9:* AUC, Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Wert, negativ prädiktiver Wert und Relatives Risiko von Markern am Tag 1 bezüglich bestätigter Infektion (Gruppe C,  $n=9$ ). Patienten mit Verdacht auf Infektion wurden von dieser Analyse ausgeschlossen.

	AUC (95%-CI)	Schwellenwert	Sens. (95%-CI)	Spez. (95%-CI)	PPV	NPV	RR
HLA-DR	0,85 (0,73-0,96)	<5792 AK / Zelle	1 (0,66-1)	0,67 (0,48-0,82)	0,45	1	>9,9
Plasma-IL-10	0,76 (0,55-0,96)	>7,3 pg/ml	0,75 (0,35-0,97)	0,84 (0,66-0,95)	0,55	0,93	7,64
total-IL-8	0,76 (0,59-0,88)	>322 pg/ml	0,56 (0,21-0,86)	0,93 (0,77-0,99)	0,71	0,87	5,54
PCT	0,77 (0,62-0,89)	>965 pg/ml	0,78 (0,40-0,97)	0,79 (0,61-0,91)	0,5	0,93	7
CRP	0,55 (0,34-0,75)*						
SIRS	0,62 (0,43-0,81)*						

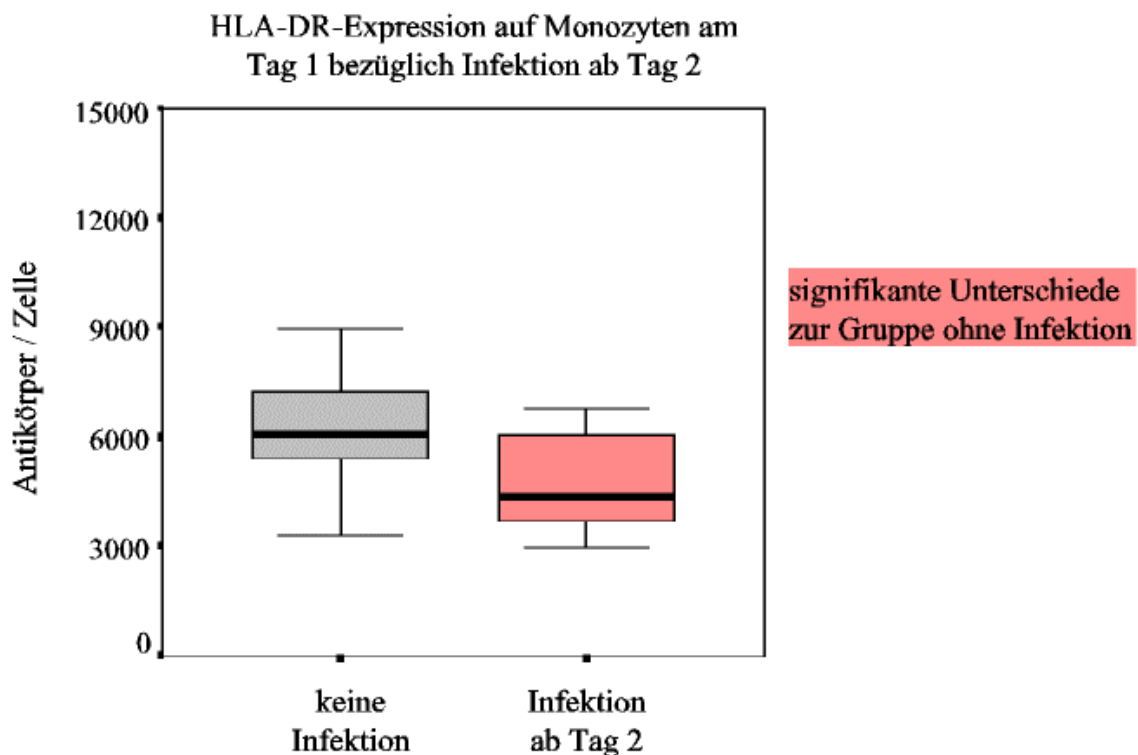
\*→ kein signifikantes diskriminatives Potenzial

#### 4.6.3 Marker am Tag 1 bezüglich Infektion ab Tag 2 (Gruppe B und C)

Während in den bisherigen Auswertungen die Entwicklung einer Infektion im 6-tägigen postoperativen Verlauf global und ohne Berücksichtigung des Zeitpunktes ihres Auftretens untersucht wurde, sollte in einer weiteren Analyse das diskriminative Potenzial der Marker mindestens 24 Stunden vor dem Auftreten dieses Zielereignisses bestimmt werden. Dafür

wurden diejenigen 6 Patienten von den Auswertungen ausgeschlossen, die bereits am ersten postoperativen Tag infektiöse Komplikationen entwickelt hatten (3 Patienten mit Verdacht auf Infektion und 3 Patienten mit bestätigter Infektion (siehe *Neuinfektionen* in *Tabelle 4 / Tabelle 5*), und es wurden die Marker am Tag 1 hinsichtlich des Auftretens von Infektion zwischen Tag 2 und Tag 6 (vermutet oder bestätigt) ausgewertet.

Von allen gemessenen Parametern einschließlich SIRS und CRP zeigten lediglich das monozytäre HLA-DR und die *ex vivo* Elastase-Produktion signifikante Unterschiede am Tag 1 zwischen Patienten mit einem unkomplizierten postoperativen Verlauf und jenen Patienten, die ab dem Tag 2 bis zum 6. postoperativen Tag Infektionen entwickelt hatten (Mann-Whitney,  $p < 0,05$  für HLA-DR und Elastase, *Abbildung 26* und *Abbildung 27*). ROC-Analysen ergaben für das HLA-DR eine AUC von 0,72 (95%-CI von 0,58-0,84 für  $p < 0,05$ ), für die *ex vivo* Elastase-Produktion eine AUC von 0,68 (95%-CI von 0,53-0,81 für  $p < 0,05$ ) für die Entwicklung einer Infektion. Optimierte Schwellenwerte, die mit Hilfe der ROC-Kurven ermittelt wurden, betrugen für die HLA-DR-Expression 4342 AK / Zelle und für die *ex vivo* Elastase-Produktion 203 ng/ml; auf dieser Basis durchgeführte Berechnungen zu Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiven Werten und dem Relativen Risiko liefert *Tabelle 10*.



*Abbildung 26:* Signifikant niedrigere monozytäre HLA-DR-Expression am Tag 1 bei Patienten mit Infektion (Gruppe B und C) zwischen Tag 2 und Tag 6 (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

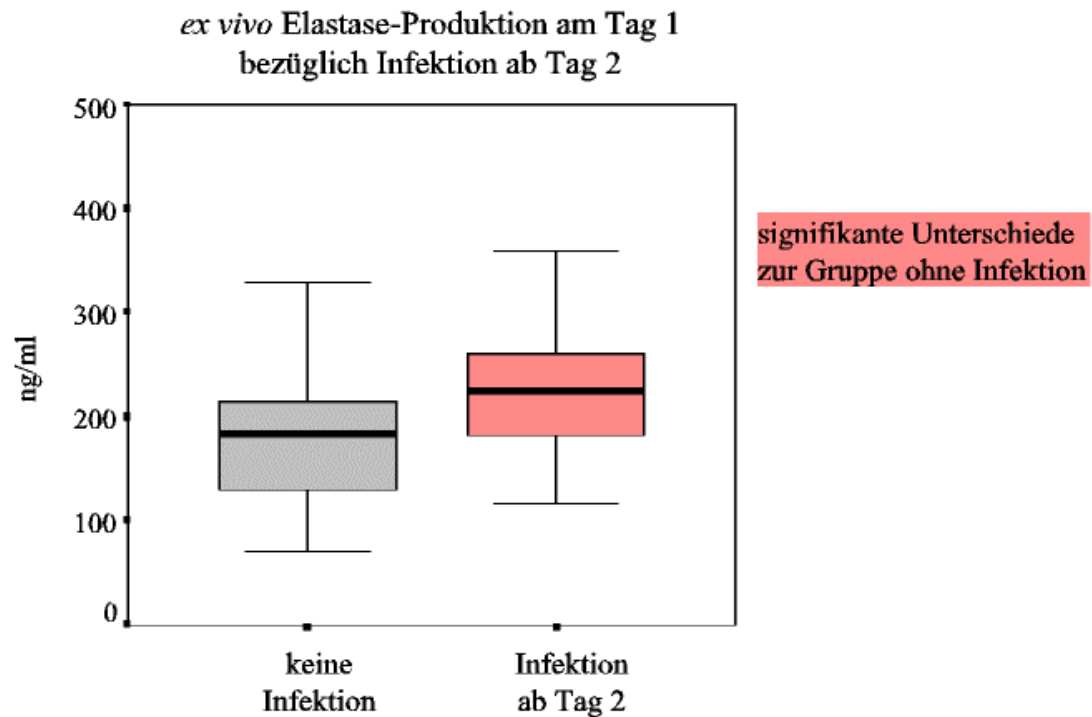


Abbildung 27: Signifikant höhere *ex vivo* Elastase-Produktion am Tag 1 bei Patienten mit Infektion (Gruppe B und C) zwischen Tag 2 und Tag 6 (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

Tabelle 10: AUC, Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Wert, negativ prädiktiver Wert und Relatives Risiko von HLA-DR auf Monozyten und *ex vivo* Elastase am Tag 1 bezüglich Infektion ab Tag 2 (vermutet (Gruppe B) oder bestätigt (Gruppe C)). Patienten mit Infektion am Tag 1 wurden von dieser Analyse ausgeschlossen ( $n=6$ ).

	AUC (95%-CI)	Schwellenwert	Sens. (95%-CI)	Spez. (95%-CI)	PPV	NPV	RR
HLA-DR	0,72 (0,58-0,84)	<4342 AK / Zelle	0,53 (0,28-0,77)	0,91 (0,76-0,98)	0,75	0,79	3,56
<i>ex vivo</i> Elastase	0,68 (0,53-0,81)	>203 ng/ml	0,56 (0,30-0,80)	0,74 (0,55-0,88)	0,53	0,77	2,27

## **5 DISKUSSION**

Kardiochirurgische Eingriffe unter Einsatz der Herzlungenmaschine führen unter dem Einfluss zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren im allgemeinen zu einer postoperativen systemischen Aktivierung des Immunsystems. Dieser Zustand, der klinisch unter dem Bild eines SIRS imponiert und per se zu Organschäden führen kann, geht mit einer systemischen Gegenregulation der Entzündung einher (CARS), um eine überschießende Inflammation zu begrenzen. Die Folge kann in einer ausgeprägten Depression des Immunsystems bis hin zur Immunparalyse bestehen, die den Organismus anfällig macht für sekundäre Infektionen. Diese wiederum können unter Umständen bis hin zum Septischen Schock und zum Multi-Organversagen führen.

Aufgrund der klinischen Relevanz infektiöser / septischer Krankheitsbilder und ihrer gesundheitsökonomischen Bedeutung ist es für den Kliniker von größter Wichtigkeit, infektiöse / septische Komplikationen vor allem bei kritisch Kranken und nach großen Operationen frühzeitig mit Hilfe geeigneter Labormarker zu diagnostizieren. Dafür ist das Verständnis der immunologischen Grundlagen von Inflammation und Antiinflammation eine wichtige Voraussetzung.

In einer prospektiven Kohortenstudie unter Risikopatienten nach kardiochirurgischen Eingriffen sollte untersucht werden, ob

1. das Modell „systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ auf die genannte Patientenpopulation übertragen werden kann,
2. es neue Marker gibt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit postoperative infektiöse Komplikationen bei diesen Patienten frühzeitig vorhersagen können,
3. eventuelle neue Marker ein höheres diskriminatives Potenzial hinsichtlich der Entwicklung postoperativer infektiöser Komplikationen haben als konventionelle Routine-Marker wie SIRS oder CRP.

Die Ergebnisse zeigen, dass Risikopatienten nach kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herzlungenmaschine postoperativ eine ausgeprägte systemische Immunaktivierung aufweisen, die sich in einer allgemeinen Erhöhung der gemessenen Immunaktivierungsmarker

niederschlägt (unter anderem total-IL-8 und *ex vivo* Elastase-Produktion). Die systemische Immunaktivierung geht einher mit einer Deaktivierung und Depression des Immunsystems, erkennbar an erhöhten Werten für Plasma-IL-10 und stark erniedrigten Werten vor allem für die monozytäre HLA-DR-Expression. Mit zunehmender Ausprägung prädisponieren diese Zustände für eine hohe Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen, was die Auswertung der klinischen Patientengruppen ergab. Das Modell „systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ lässt sich somit bei dem in dieser Studie untersuchten Patientenkollektiv bestätigen.

Die ROC-Analysen ergaben eine hohe diskriminative Aussagekraft einiger gemessener Immunmarker in bezug auf die postoperative Entwicklung einer Infektion. Vor allem die HLA-DR-Expression auf Monozyten mit einer AUC von 0,75 bezüglich der Entwicklung von Infektionen im 6-tägigen postoperativen Verlauf war den konventionellen Infektionszeichen (SIRS) und Routine-Laborbefunden (CRP) eindeutig überlegen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals verwendeten hoch-standardisierten Messverfahren (exakte Quantifizierung der Oberflächenmoleküle, semi-automatisches ELISA-Mess-System) machen eine bessere Quantifizierung des Ungleichgewichtes zwischen Inflammation und Antiinflammation möglich. Zudem konnte eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung neuer Monitoringmarker erfüllt werden, um möglicherweise in Zukunft gezieltere präemptive Interventionen zu erlauben.

## **5.1 Untersuchung des gesamten Patientenkollektivs**

### **5.1.1 Systemische Immunaktivierung des gesamten Patientenkollektivs**

Die untersuchte Patientenpopulation weist grundsätzlich eine systemische Aktivierung des Immunsystems auf. Dies zeigt sich anhand erhöhter Spiegel von total-IL-8 (*Abbildung 9*), LBP (*Abbildung 10*), CRP und IL-6, welche mit systemischer Inflammation assoziiert sind [2,7,13]. Die Immunaktivierung schlägt sich auch in einer ausgeprägten Aktivierung neutrophiler Granulozyten nieder, erkennbar an den hohen Werten für die *ex vivo* Elastase-Produktion (*Abbildung 12*) und die neutrophile CD64-Expression in allen Patientengruppen.

Neben dem allgemeinen Stress einer großen Operation (thorakotomischer Eingriff am Herzen) ist insbesondere die Herzlungenmaschine als ein bedeutender Faktor dieser allgemeinen Inflamationsreaktion anzusehen [57,58,59]. Wie im Kapitel 1.3 ausführlich dargelegt, gelten vor allem der Kontakt des Blutes mit den extrakorporalen Flächen des HLM-Apparates,

Ischämie/Reperfusionsschäden und die Translokalisierung von Endotoxin aus dem Darm als wichtige inflammatorische Trigger [60,61,62], was Untersuchungen an isolierten HLM-Einheiten und Vergleiche zwischen kardiochirurgischen Eingriffen mit versus ohne HLM-Einsatz bestätigten [61,66,67,68,69]. Dies macht die hohen systemischen Spiegel der genannten Immun-Aktivierungsmarker in der untersuchten Patientenpopulation verständlich und korreliert gut mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien an kardiochirurgischen Patienten [57,58,59,63,64,65].

Die Tatsache, dass im Unterschied zu den erhöhten systemischen total-IL-8-Spiegeln die leukozytäre IL-8-mRNA-Expression in allen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden stark erniedrigt war (*Abbildung 11*), mag auf den ersten Blick verwunderlich erscheinen. Als Ursprungszellen für die IL-8-Produktion fungieren vor allem aktivierte Endothelzellen, Monozyten und Granulozyten [2,7]. Es wird insbesondere im Entzündungsherd nach Stimulation durch TNF- $\alpha$  und IL-1 gebildet, wo es chemotaktisch und aktivierend auf Granulozyten wirkt und auf diese Weise deren Einwanderung fördert. Die stark erniedrigte leukozytäre mRNA-Expression im Blut der immunaktivierten Studienpatienten spricht dafür, dass ein großer Teil der aktivierten Immunzellen ins Entzündungsgewebe ausgewandert ist, dort große Mengen an IL-8 produziert hat, welches dann in den systemischen Kreislauf übergetreten ist. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die niedrige mRNA-Expression ein Zeichen einer bereits eingetretenen Deaktivierung der Entzündungszellen ist, so dass die hohen total-IL-8-Spiegel vor allem durch das vor der Deaktivierung bereits produzierte, durch die Erythrozytenlyse *in vitro* freigesetzte IL-8 zustande kommen.

LBP, das als LBP-LPS-Komplex eine große Bedeutung bei der Aktivierung von Monozyten/Makrophagen hat (siehe Kapitel 1.1), gehört zu den Akut-Phase-Proteinen [13]. Die bei den Studienpatienten gemessenen hohen Werte unterstreichen das Vorliegen einer systemischen Entzündung infolge des HLM-Einsatzes, ebenso wie die allgemein erhöhten Werte für IL-6 (ein Hauptmediator der systemischen Entzündung) und für CRP, dem wichtigsten in der täglichen Krankenhaus-Routine eingesetzten Entzündungs-/ Akut-Phase-Marker [2,13].

Der operative Eingriff unter HLM-Einsatz führte zu einer ausgeprägten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, was die *ex vivo* Produktion von Elastase (von aktivierten Neutrophilen produzierte Protease [2,14,15]) nach Stimulation mit PMA zeigte. Diese war bei den postoperativ untersuchten Studienpatienten signifikant höher als bei jenen 10 Patienten, die unter identischen Einschluss-Kriterien ausgewählt und präoperativ untersucht wurden. Ebenso erhöht war die neutrophile Expression von CD64, das als Fc $\gamma$ -Rezeptor auf aktivierten Neutrophilen infolge systemischer Inflammation verstärkt exprimiert wird [22,23,24,25,26].

Die Anwesenheit von LPS ist ein Stimulus für die Expression des Chemokins Rantes [91,92]. Die niedrige leukozytäre mRNA-Expression in den untersuchten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden (*Abbildung 13*) deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die beispielsweise niedrige Rantes-Spiegel mit hohen Werten des APACHE II-Scores<sup>1</sup> in Beziehung setzen konnten [93]. Die eingetretene Deaktivierung der Immunzellen im Blut könnte dafür als Erklärung dienen.

Die leukozytäre TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression bei Patienten und Probanden ergab keine signifikanten Unterschiede, obwohl Blutmonozyten als Quelle hoher TNF- $\alpha$ -Spiegel unter systemischer Immunaktivierung gelten [2,7,12]. Dies ist damit erklärbar, dass die Patienten am ersten postoperativen Tag bereits unter dem Einfluss der Immundepression mit einer verminderten monozytären Produktionskapazität von TNF- $\alpha$  standen, was die *ex vivo*-Bestimmungen von TNF- $\alpha$  nach LPS-Stimulation gezeigt haben (siehe folgenden Abschnitt und Kapitel 4.3.2). Zudem konnte in einem Rattenmodell durch Untersuchungen der mRNA-Expression in verschiedenen Geweben gezeigt werden, dass Blutmonozyten vor allem in der Frühphase nach systemischer LPS-Stimulation TNF- $\alpha$  produzieren, während 24 Stunden nach Stimulation vor allem die Leber als Produktionsort fungiert (Rupprecht et al., submitted 2005, siehe Anhang Seite I). Somit war der Zeitpunkt der ersten Messung (Tag 1 postoperativ) möglicherweise schon zu spät.

### **5.1.2 Immundepression des gesamten Patientenkollektivs**

Die allgemeine Entzündungsreaktion der Studienpatienten wurde von einer ausgeprägten Immundepression begleitet, die physiologisch dazu dient, einer überschießenden Inflammation entgegenzuwirken [1,7,8,12,32]. Insgesamt wiesen die Patienten erhöhte Spiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Plasma auf, wobei, wie in Kapitel 4.3.2 erwähnt, diese Feststellung aufgrund der unteren Nachweisgrenze von 5 pg/ml nur mit Einschränkungen zu treffen ist (*Abbildung 16*).

Die systemische Antiinflammation führte bei allen Studienpatienten zu einer starken Herunterregulierung der monozytären HLA-DR- und CD86-Expression (*Abbildung 14* und *Abbildung 15*), sowie der *ex vivo* Produktionskapazität von TNF- $\alpha$ . Dies ist als Zeichen verminderter Immunkompetenz der Patienten zu werten, da zum einen HLA-DR und CD86 an der Antigen-Präsentation auf APZ maßgeblich beteiligt sind [3], und zum anderen die Fähigkeit von Monozyten, TNF- $\alpha$  zu bilden, eine wichtige Grundvoraussetzung für die Ausbildung einer

---

<sup>1</sup> klinischer Prognosemarker bei Sepsis-Patienten

adäquaten und notwendigen Entzündungsreaktion darstellt (siehe auch Kapitel 1.1) [1,2,7,12]. Eine ausgeprägte Immundepression, in diesem Zusammenhang vor allem die stark erniedrigte monozytäre Expression von HLA-DR, war in zahlreichen Studien mit signifikant schlechterem Krankheitsverlauf und hoher Anfälligkeit für septische Komplikationen assoziiert [8,33,34,35,36,37,38,39].

Auf mRNA-Ebene fand sich eine gegenüber gesunden Probanden deutlich erhöhte leukozytäre Expression von IL-10 (*Abbildung 17*). Dies legt den Schluss nahe, dass das IL-10 neben der Leber und der Milz als Produktionsorte (tierexperimentelle Daten, Rupprecht et al., submitted 2005, siehe Anhang Seite I) auch aus aktivierten Immunzellen im Blut stammt. Diesen Ergebnissen entsprechen die hohen Werte für SOCS-3 (*Abbildung 18*), welches als ein Mediator der antiinflammatorischen Effekte von IL-10 gilt [100,101].

Dem Hitzeschockprotein HO-1, das infolge diverser Stimuli (zum Beispiel Endotoxin) über die Bildung von CO und cGMP die Gefäßmuskulatur relaxiert, aber auch anti-apoptotisch und antiinflammatorisch wirkt, konnte in verschiedenen Tierversuchsreihen eine bedeutende protektive Rolle in Zuständen des Schocks zugeschrieben werden [94,98,99]. Zwischen den untersuchten Patienten und gesunden Probanden fanden sich allerdings keine Unterschiede in der leukozytären mRNA-Expression. Möglicherweise ist die Ursache dafür, dass eine verstärkte Expression von HO-1 vor allem im Septischen Schock nachweisbar war, während die überwiegende Zahl der untersuchten Studienpatienten sich nicht im Schock befand, HO-1 somit nicht sensitiv genug für die Studienpopulation war. Damit stehen diese Ergebnisse der Studienpatienten in keinem Widerspruch zu den genannten Arbeiten.

## **5.2 Frühe Immunaktivierung am Tag 1 und persistierende Immundepression**

Sowohl die Korrelationsanalysen als auch die Auswertung der paraklinischen Patientengruppen ergaben einen Zusammenhang zwischen einer frühzeitigen ausgeprägten Immunaktivierung und einer verzögerten „Erholung“ der monozytären Expression von HLA-DR im postoperativen Verlauf.

Marker, die eine Immunaktivierung anzeigen (total-IL-8 und PCT), sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 im Plasma korrelierten, wenn auch schwach, am Tag 1 invers mit der monozytären HLA-DR-Expression im 6-tägigen postoperativen Verlauf. Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen -0,35 und -0,54 an den Tagen 1 bis 4 (*Tabelle 7*).



Als Kriterium für eine „frühzeitige ausgeprägte Immunaktivierung“ diente die Überschreitung der im Rahmen der ROC-Analysen ermittelten „optimalen“ Schwellenwerte (siehe Kapitel 4.6.1) für die Immunaktivierungsmarker total-IL-8, PCT, und den Deaktivierungsmarker IL-10 im Plasma, jeweils am Tag 1 postoperativ. Es zeigte sich, dass bei jenen Patienten, die total-IL-8-Werte oberhalb von 322 pg/ml aufwiesen, beziehungsweise PCT-Werte >650 pg/ml oder Plasma-IL-10-Werte >5,6 pg/ml, die postoperative „Erholung“ der monozytären HLA-DR-Expression signifikant vermindert war (*Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21*). Somit besteht ein statistisch nachgewiesener Zusammenhang zwischen der initialen Erhöhung der Immunaktivierungsmarker und der verminderten monozytären HLA-DR-Expression im postoperativen Verlauf, obgleich die Korrelationskoeffizienten nur mäßig hoch waren.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die durch den Einsatz der HLM verstärkte systemische Entzündung, die von einer starken Gegenregulation (IL-10) begleitet wird, eine persistierende Depression des Immunsystems mit einer Verminderung der Immunkompetenz bewirkt, was sich in der anhaltend niedrigeren HLA-DR-Expression auf Monozyten (oft deutlich unter 5000 AK/Monozyt) im postoperativen Verlauf äußert.

### **5.3 Untersuchung der klinischen Patientengruppen**

#### **5.3.1 Erhöhte systemische Immunaktivierung bei Patienten mit postoperativer Infektion**

Die Auswertungen der klinischen Patientengruppen – A) Patienten ohne Infektion im 6-tägigen postoperativen Verlauf, B) Patienten mit klinischem Verdacht auf Infektion und C) Patienten mit mikrobiologisch bestätigter Infektion – ergaben, dass die Immunaktivierung bei Patienten mit Infektion weit ausgeprägter war, als bei jenen Patienten, die einen unkomplizierten postoperativen Verlauf zeigten.

So fanden sich für total-IL-8 bei Patienten mit vermuteter Infektion deutlich erhöhte Werte an den Tagen 1 bis 4, bei Patienten mit bestätigter Infektion an den Tagen 1 bis 5, jeweils im Vergleich zu den Patienten ohne Infektion (*Abbildung 9*).

PCT, bei Patienten ohne Infektion meist unauffällig, war bei Patienten mit Verdacht auf Infektion am Tag 2, bei Patienten mit bestätigter Infektion an den Tagen 1, 2 und 4 signifikant erhöht (*Abbildung 22*). Dies steht grundsätzlich im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen IL-8 und PCT mit dem klinischen Verlauf bei Patienten nach HLM-OP korrelierten und ein schlechterer Verlauf mit einer stärkeren systemischen Entzündung assoziiert war [77,82,83,86]. Insbesondere das erhöhte PCT, welches in diversen Geweben synthetisiert

wird und als „Sepsis-Marker“ zunehmende Bedeutung erlangt hat [76,77,79,80,81,82,83,84], ist als deutlicher Hinweis auf die LPS-Translokalisierung aus dem Darm zu werten, da Endotoxin als einer der Haupttriggerfaktoren für PCT gilt [2]. Während PCT-Anstiege infolge (schwerer) Sepsis auf hohem Niveau persistieren, kommt es hingegen nach transientser Endotoxinämie nur zu einem kurzen Anstieg des PCT, das dann mit einer Halbwertszeit (HWZ) von circa 24 Stunden wieder abfällt. Dies war bei den untersuchten Studienpatienten der Fall, was die Hypothese der transienten Endotoxinämie stützt.

Hohe Werte der *ex vivo* Elastase-Produktion an den Tagen 1 und 2 bei Patienten mit Infektion, signifikant für die Gruppe mit Verdacht auf Infektion (*Abbildung 12*), sprechen für einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Grad der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und der Infektanfälligkeit. Die neutrophile CD64-Expression dagegen zeigte in den ersten postoperativen Tagen keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen; in den Infektionsgruppen war sie am Tag 4 und 5 (Gruppe B), beziehungsweise nur am Tag 5 (Gruppe C) signifikant erhöht. Dem stehen eine Reihe von Studien gegenüber, in denen CD64 auf Neutrophilen mit der Schwere septischer Krankheitsbilder korrelierte und vor allem bei Patienten im Septischen Schock stark erhöht war [23,24,25,26]. Bei den untersuchten Studienpatienten dagegen fällt die Änderung der neutrophilen CD64-Expression in den Patientengruppen mit Infektion eher gering aus. Eine Ursache dafür könnte sein, dass in der Studienpopulation in erster Linie zwischen SIRS-Patienten ohne Infektion und Sepsis-Patienten unterschieden wird, fortgeschrittene Sepsis-Stadien (Schwere Sepsis, Septischer Schock, MODS) jedoch unter den Patienten mit Infektion nicht (oder kaum) zu finden sind.

Eine Reihe von Immunaktivierungsmarkern zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen, darunter das LBP, IL-6, CRP, monozytäre Expressionen von CD71, CD64 und CD11b, sowie CD11b auf Neutrophilen.

Die gleichartige Erhöhung von LBP in allen drei Patientengruppen (*Abbildung 10*) spricht dafür, dass es sich beim LBP um einen für die Untersuchung von HLM-OP-Patienten zu empfindlichen Marker handelt. Dieser ist zwar in der Lage, die systemische Entzündung infolge des HLM-Einsatzes mit erhöhten Werten anzuzeigen, nicht aber zwischen der Schwere der Immunaktivierung in der Patientengruppe ohne Infektion im Vergleich zu den Infektionsgruppen zu unterscheiden.

IL-6 wird als potenzieller Marker für den Verlauf septischer Krankheitsbilder angesehen, allerdings mit unterschiedlichen Studienergebnissen [82,83,84,85,86,87]. In dieser Studie zeigte IL-6 am Tag 1 keine signifikanten Gruppenunterschiede, ähnlich wie das CRP; möglicherweise wären in fortgeschrittenen Sepsis-Stadien höhere Werte gemessen worden. Folglich sind IL-6

und CRP nicht spezifisch genug für die Unterscheidung zwischen SIRS und den Patientengruppen mit Infektion.

CD71 und CD64 auf Monozyten zeigten ebenso keine signifikanten Gruppenunterschiede. Über das Integrin CD11b werden Korrelationen mit fortgeschrittenen Sepsis-Stadien und MODS berichtet [16,17,18,19,20,21,22]. In der untersuchten Studienpopulation fanden sich keine Gruppenunterschiede, möglicherweise aus ähnlichen Gründen wie für IL-6 und CRP vermutet. Auf mRNA-Ebene gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der leukozytären Expression von Rantes, TNF- $\alpha$  und IL-8 zwischen den Patientengruppen.

### **5.3.2 Ausgeprägte Immundepression bei Patienten mit postoperativer Infektion**

Die höhere Immunaktivierung der Patienten in den Infektionsgruppen im Vergleich zur Patientengruppe ohne Infektion ging mit höheren Plasma-Spiegeln des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 am Tag 1 einher, signifikant für die Patientengruppe mit bestätigter Infektion (*Abbildung 16*). Dies führte zu einer ausgeprägteren Verminderung der monozytären HLA-DR-Expression bei Patienten mit Infektion, erkennbar an den signifikant niedrigeren Werten für Patienten mit vermuteter Infektion an den Tagen 1 und 3 und jenen mit bestätigter Infektion an den Tagen 1, 3 und 5 (*Abbildung 14*). Bei diesen Patienten blieb das monozytäre HLA-DR meist deutlich unter 5000 AK/Monozyt. Auch die Fähigkeit, *ex vivo* TNF- $\alpha$  zu produzieren, war in der Gruppe C an den Tagen 2 und 3 signifikant vermindert.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass diese in den Infektionsgruppen zu beobachtende starke Verminderung der Immunkompetenz (niedrige monozytäre HLA-DR-Expression, niedrige *ex vivo* TNF- $\alpha$ -Produktionskapazität) dazu führt, dass die Patienten auf bereits vorhandene oder im Verlauf sekundär erworbene Krankheitserreger nicht mehr adäquat reagieren konnten und auf diese Weise anfällig für Infektionen wurden. Somit fand eine übermäßige antiinflammatorische Gegenregulation über das physiologisch notwendige Maß hinaus statt, die zusammen mit dem ausgeprägten operativen Stress und der damit verbundenen Sekretion von Glukokortikoiden und Adrenalin bei diesen Patienten die Immunkompetenz stark vermindert hat. Dies steht im Einklang mit zahlreichen Studien, die einen Zusammenhang zwischen Immundepression, vor allem in Form stark verminderter monozytärer HLA-DR-Expression, und dem klinischen Verlauf septischer Krankheitsbilder zeigen konnten [33,34,35,36,37,38]. Allerdings konnten die Ergebnisse einer Studie, in der eine verminderte monozytäre Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 bei kritisch Kranken mit Sepsis nachgewiesen wurde [38], nicht bestätigt werden; CD86 auf Monozyten war in allen Patientengruppen gleichermaßen erniedrigt (*Abbildung 15*).

Die leukozytären mRNA-Expressionen von IL-10 und SOCS-3 zeigten ebenfalls keine signifikanten Gruppenunterschiede (*Abbildung 17* und *Abbildung 18*), obwohl angesichts der hohen Plasma-IL-10-Spiegel bei den Patienten mit bestätigter Infektion Gruppenunterschiede möglicherweise zu erwarten gewesen wären. Der Grund dafür könnte sein, dass die mRNA-Untersuchungen nur an 41 anstatt der 56 ausgewerteten Studienpatienten durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.3). Dies hatte zur Folge, dass die Gruppe mit bestätigter Infektion aus 4 anstatt 9 Patienten bestand und damit die Fallzahl für diese Auswertung möglicherweise zu gering war. Auch die leukozytäre HO-1-Expression zeigte keinerlei Gruppenunterschiede.

#### **5.4 Bestätigung des immunologischen Modells**

Der Einsatz der HLM führt, zusätzlich zum operativen Stress, grundsätzlich zu einer systemischen Entzündung, die bei vielen Patienten im Verlauf abklingt und keinerlei Komplikationen nach sich zieht. Die deutlich stärkere Immunaktivierung bei den Studienpatienten mit Infektion, die sich vor allem in höheren Spiegeln von total-IL-8, PCT und *ex vivo* Elastase äußerte, mit konsekutiv deutlich stärkerer Deaktivierung (Plasma-IL-10 erhöht) legt den Schluss nahe, dass bei diesen Patienten die Homöostase zwischen Inflammation und Antiinflammation gravierend gestört war. Die Folge war eine ausgeprägte Depression des Immunsystems in Form einer stark verminderten Fähigkeit der Monozyten, Antigene zu präsentieren (monozytäres HLA-DR oft weit unterhalb von 5000 AK/Monozyt) und *ex vivo* TNF- $\alpha$  zu produzieren. Dies wiederum machte diese Patienten besonders anfällig für sekundäre Infektionen, beziehungsweise führte zu einer unzureichenden inflammatorischen Antwort auf die primär auslösende Infektion. In *Abbildung 28* sind die unterschiedlichen klinischen Verläufe in Abhängigkeit von der initialen Entzündungsreaktion schematisch dargestellt. Demnach lassen sich (im Idealfall) solche Patienten mit einer leichten postoperativen Entzündungsreaktion und einem konsekutiv unkomplizierten klinischen Verlauf von jenen Patienten unterscheiden, die initial eine starke Entzündungsreaktion aufweisen und durch hohe PCT-Spiegel (infolge besonders ausgeprägter Endotoxin-Translokation im Darm? Zytokin-Polymorphismen?) imponieren. Die dadurch bedingte HLA-DR-Herunterregulation kann dann zu infektiösen Komplikationen / Sepsis führen.

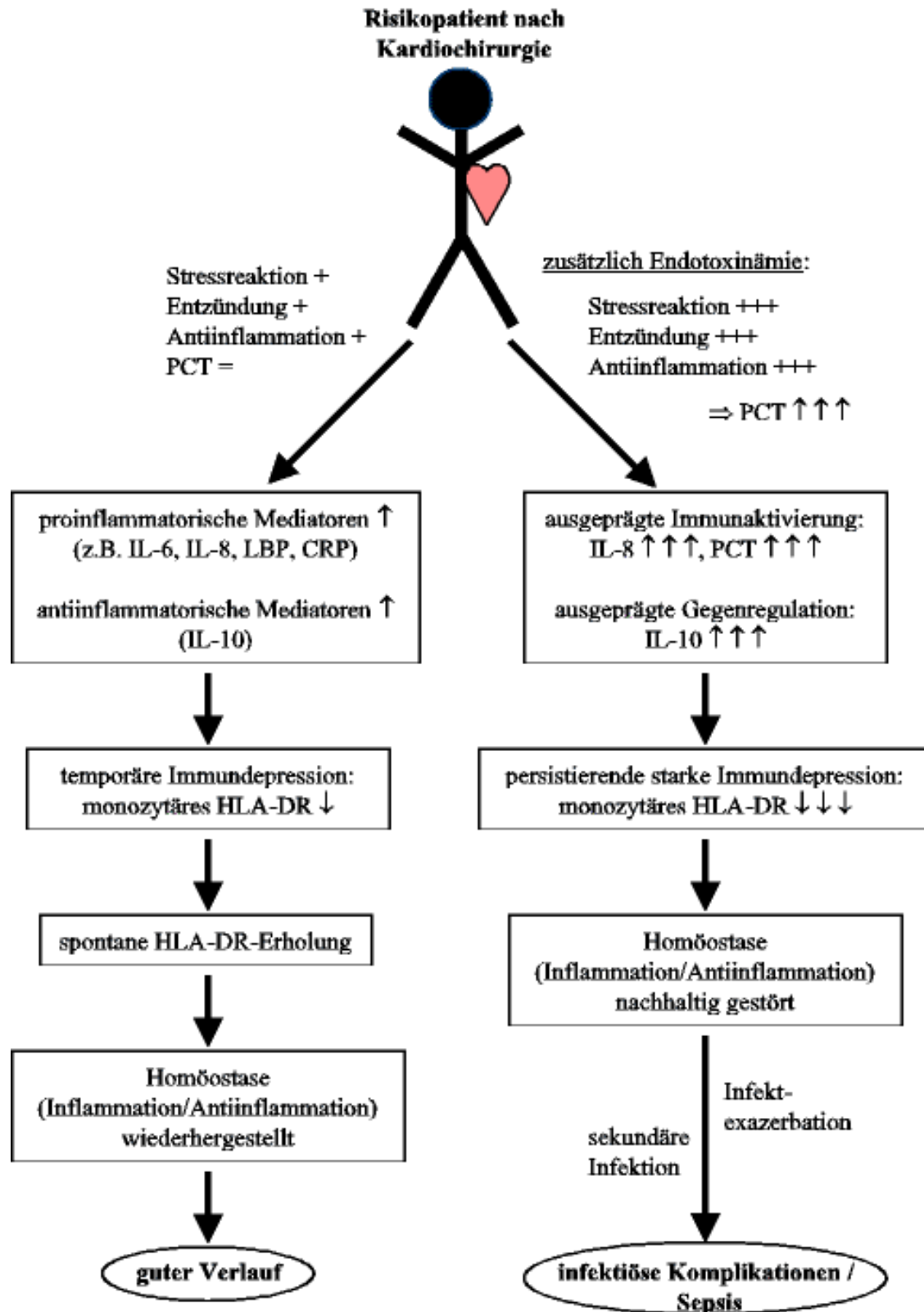


Abbildung 28: Schema der unterschiedlichen postoperativen Verläufe. Die Ausprägung der frühen postoperativen Entzündungs- und Stressreaktion prädisponiert für den weiteren klinischen Verlauf.

Auf der Basis der Studienergebnisse erscheinen diese Zusammenhänge schlüssig. Insofern kann das Modell „systemische Immunaktivierung – Immundeaktivierung mit Immundepression – erhöhte Infektanfälligkeit“ bei den untersuchten Risikopatienten nach kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herzlungenmaschine als bestätigt angesehen werden.

## 5.5 Immunmarker für die Prädiktion von postoperativer Infektion

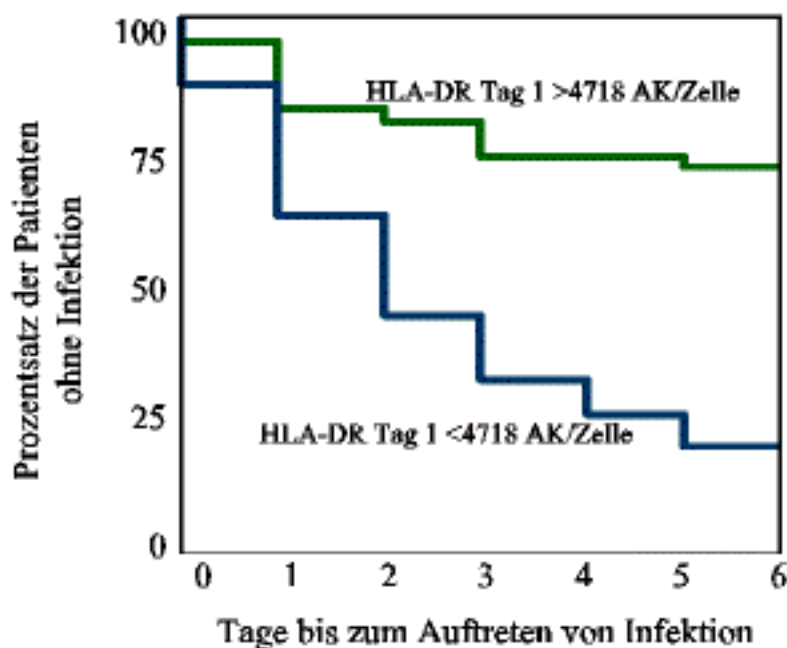
Von besonderer klinischer Relevanz im Zusammenhang mit den Veränderungen auf Mediator-Ebene während systemischer Immunaktivierung und Immundepression ist die Frage, welches Potenzial immunologische Parameter hinsichtlich ihrer Eignung als diagnostische Infektionsmarker haben. Da konventionelle Infektionszeichen und –marker, wie in Kapitel 1.2 und in Kapitel 2 ausführlich dargelegt, große Schwächen in der Diagnostik der verschiedenen Entzündungs- und Sepsis-Stadien aufweisen [5,74,75,76], wurden für die in dieser Studie untersuchten Immunparameter ROC-Analysen durchgeführt, mit dem Ziel, Infektionen im postoperativen Verlauf frühzeitig vorherzusagen. Dafür kamen in erster Linie solche Marker in Betracht, die signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit versus ohne Infektion während der 6-tägigen Beobachtungsdauer bereits am ersten postoperativen Tag zeigten.

Es stellte sich heraus, dass die monozytäre Expression von HLA-DR das höchste Potenzial für die Prädiktion von Infektion hatte, mit einer Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) von 0,75 (*Tabelle 8*). Für die Unterschreitung des Schwellenwertes 4718 AK/Monozyt ergab sich eine Sensitivität von 0,57 und eine Spezifität von 0,88. Prädiktive Werte (positiv und negativ) für die Entwicklung von Infektion lagen bei 0,75. Das Relative Risiko, bei Unterschreitung dieses Schwellenwertes infektiöse Komplikationen zu entwickeln, war circa 3-fach erhöht, verglichen mit Patienten mit HLA-DR-Werten oberhalb von 4718 AK/Monozyt am Tag 1. Im Vergleich dazu war total-IL-8 mit einer AUC von 0,73 ähnlich potent für die Diskriminierung von Patienten mit versus ohne Infektion, *ex vivo* Elastase kam auf 0,72, die AUCs von Plasma-IL-10 und PCT waren jeweils 0,68.

Demgegenüber stehen entsprechende Auswertungen der konventionellen klinischen Infektionsmarker: zum einen konnte das CRP in der Studienpopulation nicht signifikant zwischen Patienten mit Infektion und solchen mit einem komplikationslosen Verlauf unterscheiden (AUC von 0,58 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,42-0,73). Zum anderen erreichten mindestens 2 positive SIRS-Kriterien am Tag 1 nur eine AUC von 0,66 bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,52-0,81. Zwar konnte damit den SIRS-Kriterien ein gewisses diskriminatives Potenzial zugeschrieben werden. Allerdings muss man anmerken, dass positive

SIRS-Kriterien in allen Patienten mit vermuteter und bestätigter Infektion zumindest an dem Tag vorgelegen haben, an dem die Infektion auftrat, da positive SIRS-Kriterien eine Voraussetzung für die Einstufung eines Patienten in eine der Infektionsgruppen waren (siehe Kapitel 4.1). Insofern können in diesen Auswertungen SIRS-Kriterien nicht als ein unabhängiger Marker für Infektion betrachtet werden. Die Tatsache, dass über 80 % der Patienten mit Infektion mindestens 2 positive SIRS-Kriterien bereits am Tag 1 zeigten (Sensitivität von 0,83), unterstreicht diesen Aspekt. Vor diesem Hintergrund ist die AUC von 0,66 für mindestens 2 positive SIRS-Kriterien bezüglich des Auftretens von Infektion als gering einzuschätzen.

Somit waren die untersuchten Immunparameter den klassischen Routinemarkern in der Prädiktion infektiöser Komplikationen deutlich überlegen. In *Abbildung 29* und *Abbildung 30* sind Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, die die Abnahme des Anteils der infektfreien Patienten im postoperativen Verlauf in Abhängigkeit von der Unter- beziehungsweise Überschreitung der Tag 1-Schwellenwerte für HLA-DR und CRP zeigen: lediglich 25 % der Patienten mit Tag 1-Werten für HLA-DR unter 4718 AK/Monozyt waren nach 6 Tagen infektfrei, während bei Überschreitung des CRP-Schwellenwertes von 5,84 mg/dl am Tag 1 circa 50 % keine Infektion bis zum Tag 6 entwickelt hatten. Dadurch wird das deutlich höhere diskriminative Potenzial von HLA-DR im Vergleich zum konventionellen Routine-Marker CRP unterstrichen.



*Abbildung 29:* Kaplan-Meier Kurven mit dem Prozentsatz an infektfreien Patienten in Abhängigkeit vom Über- / Unterschreiten des Tag 1- Schwellenwertes für das monozytäre HLA-DR. Die Kurven unterschieden sich signifikant voneinander (Log-Rank-Test,  $p < 0,05$ ).

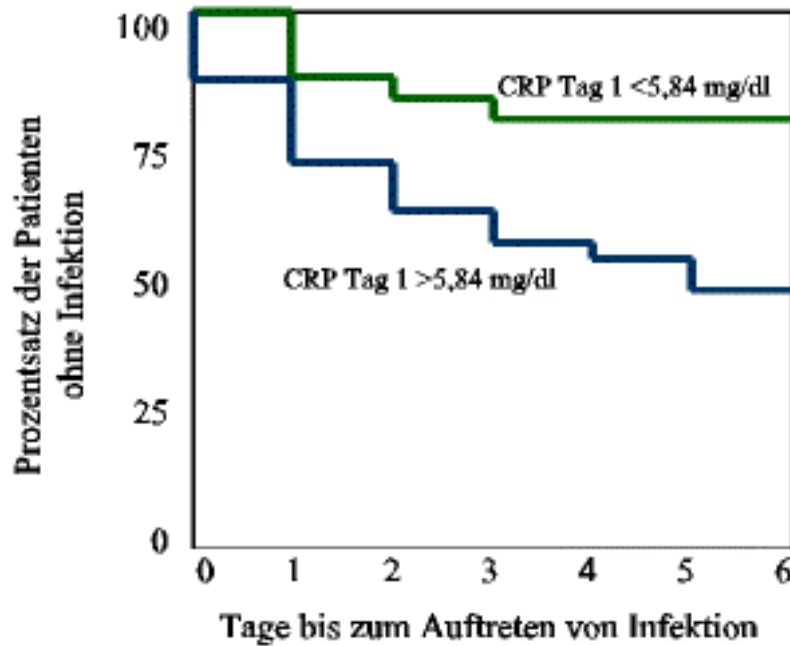


Abbildung 30: Kaplan-Meier Kurven mit dem Prozentsatz an infektfreien Patienten in Abhängigkeit vom Über- / Unterschreiten des Tag 1- Schwellenwerte für CRP. Auch in diesem Fall unterschieden sich die Kurven signifikant voneinander (Log-Rank-Test,  $p < 0,05$ ).

Durch die Kombination der Unter- beziehungsweise Überschreitung mehrerer Marker-Schwellenwerte wurde zum Teil eine sehr hohe Spezifität für die Entwicklung einer Infektion erreicht: so entwickelten alle Patienten mit bezogen auf die Schwellenwerte vermindertem HLA-DR und erhöhtem total-IL-8 eine Infektion im postoperativen Verlauf, so dass die Spezifität und der positiv prädiktive Wert dieses „diagnostischen Kombinations-Tests“ bei jeweils 1 lagen (Tabelle 8).

In einer weiteren ROC-basierten Auswertung wurde die Patientengruppe mit Verdacht auf Infektion ( $n=14$ ) ausgeschlossen, und es wurden die AUCs einiger Marker bezüglich der Entwicklung von mikrobiologisch bestätigter Infektion bestimmt. Hierbei ergab sich für HLA-DR eine AUC von 0,85, die AUC für PCT lag bei 0,77, und die AUCs für total-IL-8 und Plasma-IL-10 betrugen 0,76 (Tabelle 9). Bezogen auf die Unterschreitung des Tag 1-Schwellenwertes für HLA-DR von 5792 AK/Monozyt ergaben sich eine Sensitivität und ein negativ prädiktiver Wert von jeweils 1 für das Auftreten von bestätigter Infektion, so dass bei allen 9 Patienten, die im postoperativen Verlauf eine mikrobiologisch bestätigte Infektion entwickelten, die monozytäre HLA-DR-Expression unterhalb von 5792 AK/Monozyt am Tag 1 lag, beziehungsweise zeigten alle Patienten mit höheren HLA-DR-Werten einen komplikationslosen postoperativen Verlauf. Diese Ergebnisse unterstreichen das hohe Potenzial dieser Immunparameter insbesondere für die Prädiktion von mikrobiologisch bestätigter Infektion.



Außerdem wurde untersucht, ob die Marker in der Lage sind, infektiöse Komplikationen mindestens 24 Stunden vor deren klinischer Manifestation anzuzeigen. Dafür wurden jene Patienten von der Analyse ausgeschlossen, die bereits am ersten postoperativen Tag Infektionen entwickelt hatten (n=6), und es wurden ROC-Analysen mit Markern am Tag 1 hinsichtlich des Auftretens von Infektion ab dem zweiten bis zum 6. postoperativen Tag (vermutet oder bestätigt) durchgeführt. Auch in dieser Auswertung erwies sich das monozytäre HLA-DR als potentester Marker für die Diskriminierung von Patienten mit versus ohne Infektion. Die AUC betrug 0,72, während *ex vivo* Elastase in dieser Auswertung eine AUC von 0,68 erreichte (*Tabelle 10*). Bei einer Unterschreitung des optimierten Schwellenwertes für HLA-DR von 4342 AK / Zelle am Tag 1 betrug die Spezifität für die Entwicklung von Infektion ab dem zweiten postoperativen Tag über 0,9, positiv und negativ prädiktive Werte lagen zwischen 0,75 und 0,79. Dies zeigt, dass das monozytäre HLA-DR bereits am Tag 1 in der Lage war, infektiöse Komplikationen, die sich klinisch mindestens 24 Stunden später manifestierten, vorherzusagen, wozu mit Ausnahme der *ex vivo* Elastase kein weiterer Parameter in der Lage war.

## 5.6 Klinische Relevanz

Der operative Eingriff an sich sowie im Falle von Herzoperationen der Einsatz der Herzlungenmaschine bedeuten für den Patienten besondere Belastungen, die unter dem starken Einfluss der immunologischen Veränderungen stehen. Diese Veränderungen im „Status“ des Immunsystems, insbesondere im Grad der Immunaktivierung und –deaktivierung bis hin zur Immunparalyse, sind eng mit dem klinischen Verlauf in Form von Organdysfunktionen und infektiösen Komplikationen assoziiert. Daher ist das Verständnis der immunologischen Grundlagen der zu Grunde liegenden Prozesse eine wichtige Voraussetzung für die Verbesserung von Diagnostik und Therapie. Ein wichtiger Baustein ist in diesem Zusammenhang die Analyse der Studienpatienten sowohl in bezug auf die unterschiedlichen immunologischen Veränderungen im postoperativen Verlauf als auch hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs, was schematisch in *Abbildung 28* dargestellt ist.

Septische Krankheitsbilder zählen zu den häufigsten Todesursachen auf nicht-kardiologischen Intensivstationen mit jährlichen Kosten in Milliardenhöhe [9,10,11]. Medizinische Fortschritte allgemein und Fortschritte in der Intensivmedizin speziell führen zu einer zunehmenden Inzidenz und Prävalenz. Gerade die Früherkennung von infektiösen Komplikationen ist von größter Wichtigkeit, um rechtzeitig adäquat präemptiv intervenieren zu können und eine Zunahme der Krankheitsschwere, zum Beispiel von einer Infektion über eine „einfache“ zu einer Schweren

Sepsis oder zum Septischen Schock, zu verhindern. Daher sind Marker, die auf ein hohes Risiko für infektiöse Komplikationen hindeuten, im klinischen Alltag außerordentlich wichtig, da zahlreiche Entscheidungen des Kliniklers von der Einschätzung des postoperativen Verlaufes abhängen, wie zum Beispiel die antibiotische Prophylaxe und Therapie, der Zeitpunkt der Extubation und die Entscheidung über die Verlegung eines Patienten von der Intensiv- auf die Normalstation. Konventionelle Infektionszeichen und -marker gelten zum Teil als sehr unspezifisch in der Unterscheidung verschiedener Sepsis-Stadien und als nicht sensitiv genug vor allem für die frühzeitige Diagnosestellung, was unseren Ergebnissen entspricht.

In dieser Studie konnten eine Reihe von neuen, noch nicht etablierten Parametern des Immunsystems Infektionen bei Risikopatienten nach kardiochirurgischen Eingriffen vorhersagen. Die ROC-Analysen ergaben insbesondere für monozytäres HLA-DR eine deutlich höhere diskriminative Aussagekraft im Vergleich zu Routinemarkern. Basierend auf diesen Daten entwickeln beispielsweise über 3/4 der Patienten innerhalb der ersten 6 postoperativen Tage eine systemische Infektion (positiv prädiktiver Wert von 0,76), wenn die Homöostase von Inflammation und Antiinflammation besonders stark gestört ist und für HLA-DR am Tag 1 weniger als 4718 AK/Monozyt bestimmt werden. Insofern können diese Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung des klinischen Immunmonitorings leisten, indem sich anbahnende infektiöse Komplikationen frühzeitig erkannt werden können. Durch ihre hohe diskriminative Aussagekraft können diese Marker besser als konventionelle Infektzeichen und das CRP zur Verlaufsbeurteilung beitragen und dem Kliniker in vielen Fällen als Entscheidungshilfe dienen.

In dieser Studie wurde erstmals ein derartig komplexes, hochstandardisiertes Immunmonitoring-Programm bei einem solchen Patientenkollektiv angewendet. Es können durch die Angabe der durchschnittlich gebundenen Antikörper pro Zelle mit Hilfe des QuantiBRITE™ PE-Kits für die Bestimmung der Oberflächenproteine häufig auftretende Messdifferenzen gemindert werden (Interassay-Varianz  $cv < 8\%$  (interne Qualitätskontrolle, Institut für Medizinische Immunologie der Charité (CCM))), die durch laborspezifische Einflüsse entstehen, wie zum Beispiel durch unterschiedliche Geräte- oder Laser-Einstellungen, unterschiedliche Eigenschaften der jeweiligen Antikörper-Charge, und andere. Durch die Verwendung des halb-automatischen IMMULITE®-Systems für die ELISA-Messungen wird das Standardisierungs-Niveau der Mess-Prozeduren deutlich erhöht, und Unterschiede zwischen verschiedenen Laboren können vermindert werden (Verkleinerung der Interassay-Varianz  $cv$  zum Beispiel von Plasma-IL-10 auf  $< 6\%$  (Institut für Medizinische Immunologie der Charité (CCM))). Damit wird eine wichtige Voraussetzung für das Design zukünftiger internationaler Multicenterstudien erfüllt und

eine bedeutende Grundlage für die Etablierung dieser neuen Marker geschaffen. Zudem ist es durch diesen hohen Standardisierungsgrad der verwendeten Messmethoden möglich, für jene Patienten mit besonders hohem postoperativen Infektionsrisiko (circa 3-fach erhöht, siehe *Tabelle 8*) das Ausmaß der Immunaktivierung (total-IL-8 >322 pg/ml am Tag 1) und der Immundepression (<4718 HLA-DR-AK/Monozyt am Tag 1) quantitativ anzugeben.

## 5.7 Einschränkende Aspekte der Auswertungen

Einschränkend muss in bezug auf die Ergebnisse angemerkt werden, dass von den 81 Studienpatienten, die mindestens für 3 Tage beobachtet werden konnten, 25 Patienten ausgeschlossen werden mussten. Bei diesen Patienten stimmten die Verordnung von Antibiotika, die eine zentrale Rolle bei der Einstufung eines Patienten in eine Infektionsgruppe spielte, und das Auftreten von Infektionszeichen im Rahmen der klinischen Auswertungen nicht eindeutig überein, entweder weil die Anordnung eines therapeutischen Antibiotikums ohne klare, *im nachhinein* nachvollziehbare Infektzeichen erfolgte, oder weil Infektzeichen vorlagen, ohne dass sich dies im Ansetzen eines therapeutischen Antibiotikums widerspiegelt hätte. Unter den ausgeschlossenen Patienten befanden sich zudem solche Patienten, bei denen entgegen dem internen Standardprozedere eine verlängerte antibiotische Prophylaxe (>48h postoperativ) durchgeführt wurde. Der Ausschluss eines nicht unerheblichen Anteiles der Patienten, immerhin 25 von 81 (=31 %), geht notwendigerweise zu Lasten der repräsentativen Aussagekraft des ausgewerteten Patientenkollektivs für die Grundgesamtheit. Die klinischen Kriterien für die Patientengruppen mit Infektion und die auf dieser Basis erzielten Ergebnisse lassen sich somit auf einen Teil der Patienten der Grundgesamtheit nicht anwenden.

Des weiteren bestand bei vielen Studienpatienten das Problem einer frühzeitigen Verlegung in periphere Krankenhäuser, was sich in den abnehmenden Patientenzahlen an den Tagen 4 bis 6 niederschlägt. Frühzeitig verlegt wurden in erster Linie Patienten mit einem bis dahin unkomplizierten postoperativen Verlauf, weshalb die Abnahme von *n* in den Infektionsgruppen weit geringer ausfällt (siehe *n* in *Tabelle 4* und *Tabelle 5*). In den Auswertungen wurde bei frühzeitig verlegten Patienten aus der Gruppe ohne Infektion angenommen, dass es im weiteren Verlauf bis zum 6. postoperativen Tag zu keinen infektiösen Komplikationen gekommen war, obwohl Informationen bezüglich des weiteren Verlaufes von den sekundären Krankenhäusern nicht in jedem Fall zu erhalten waren. Man kann dennoch davon ausgehen, dass diese Annahme lediglich in einigen Einzelfällen nicht korrekt gewesen ist, und somit die Ergebnisse davon nur sehr geringfügig beeinflusst wurden.

## 5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen das Modell „Systemische Immunaktivierung – Gegenregulation mit Immundepression – hohe Infektanfälligkeit“ bei Risikopatienten nach Kardiochirurgie unter Einsatz der Herzlungenmaschine. Eine Homöostase von systemischer Inflammation auf der einen Seite und Antiinflammation auf der anderen Seite ist für den klinischen Verlauf nach großen Operationen von großer Bedeutung. Insbesondere durch den Einfluss der HLM wird ein zusätzlicher Entzündungsreiz geschaffen, der bei einigen Patienten zu einer ausgeprägten Störung dieses Gleichgewichtes führt. Eine bei einigen Patienten besonders starke Depression des Immunsystems mit starker Verminderung der Immunkompetenz in Form der Herunterregulation von monozytärem HLA-DR auf deutlich unter 5000 AK/Monozyt führt dazu, dass diese Patienten signifikant häufiger infektiöse Komplikationen entwickeln. In weiteren Studien könnte dieses Modell präzisiert und quantifiziert werden mit dem Ziel einer differenzierten Therapie fortgeschrittener Sepsis-Stadien, die sich an den Werten beispielsweise für die Immunkompetenz orientiert. Bei den untersuchten Studienpatienten bedeutete eine Immundepression, die sich in weniger als 4718 HLA-DR-AK/Monozyt am Tag 1 äußerte, eine deutlich höhere postoperative (erste 6 Tage) Infektanfälligkeit. In der Tat gibt es Anzeichen dafür, dass eine durch IFN- $\gamma$  herbeigeführte „HLA-DR-Erholung“ bei Patienten mit schwerer Sepsis und initial niedrigem monozytärem HLA-DR den Krankheitsverlauf verbessert [34].

Die untersuchten Immunmarker, allen voran das monozytäre HLA-DR, zeigten bereits am ersten postoperativen Tag eine deutlich höhere diskriminative Aussagekraft als konventionelle Infektionszeichen und –marker der täglichen Krankenhaus-Routine und waren in der Lage, infektiöse Komplikationen bereits Tage vor deren klinischer Manifestation vorherzusagen. Diese Ergebnisse könnten in Kombination mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien in näherer Zukunft eine deutliche Verbesserung in der Sepsis-Diagnostik darstellen. Durch die Verwendung hochstandardisierter Messmethoden wurde in dieser Studie eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von Multicenterstudien erfüllt. In weiteren prospektiven Studien müssen die Marker validiert werden mit dem Ziel, HLA-DR, Plasma-IL-10, total-IL-8 und *ex vivo* Elastase in der klinischen Praxis zu etablieren und diese zu einer Basis für präemptive Interventionsstrategien zu entwickeln.

## REFERENZEN

- [1] Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996 Jul;24(7):1125-8.
- [2] Till U. *Pathophysiologie / Pathobiochemie systematisch*. 1. Auflage. Uni-Med 1999.
- [3] Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medizinische Mikrobiologie*. 10. Auflage. Thieme 2001.
- [4] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74.
- [5] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003 Apr;29(4):530-8.
- [6] Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet.* 1998 May;351(9114):1501-5.
- [7] Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997 Jul;112(1):235-43.
- [8] Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, The TH. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med.* 1999 Sep;55(3):132-41.
- [9] [www.sepsis-gesellschaft.de](http://www.sepsis-gesellschaft.de)
- [10] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7):1303-10.
- [11] Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med.* 2002 Oct;28(10):1440-6.
- [12] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002 Dec;420(6917):885-91.
- [13] Schumann R, Zweigner J. A novel Acute-Phase Marker: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP). *Clin Chem Lab Med.* 1999; 37(3):271-4.
- [14] Ludemann J, Schulte KL, Hader O, Brehme S, Volk HD, Docke WD. Leukocyte/endothelium activation and interactions during femoral percutaneous transluminal angioplasty. *Vasc Surg.* 2001 Jul-Aug;35(4):293-301.
- [15] Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB Jr, Henson PM, Worthen GS. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest.* 1986 Apr;77(4):1233-43.
- [16] Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg.* 1993 Apr;128(4):390-5.
- [17] Takala A, Jousela I, Jansson SE, Olkkola KT, Takkunen O, Orpana A, Karonen SL, Repo H. Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clin Sci (Lond).* 1999 Nov;97(5):529-38.
- [18] Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. *Chest.* 1993 Sep;104(3):847-53.

- [19] Maekawa K, Futami S, Nishida M, Terada T, Inagawa H, Suzuki S, Ono K. Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma*. 1998 Mar;44(3):460-8.
- [20] Takala A, Jousela I, Olkkola KT, Jansson SE, Leirisalo-Repo M, Takkunen O, Repo H. Systemic inflammatory response syndrome without systemic inflammation in acutely ill patients admitted to hospital in a medical emergency. *Clin Sci (Lond)*. 1999 Mar;96(3):287-95.
- [21] Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Losche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002 Apr;17(4):263-8.
- [22] Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med*. 2000 Jul;26(7):883-92.
- [23] Davis BH, Bigelow NC, Curnutte JT, Ornvold K. Neutrophil CD64 expression: Potential diagnostic indicator of acute inflammation and therapeutic monitor of interferon gamma therapy. *Lab Hem*. 1995;1:3-12.
- [24] Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol*. 2001 Aug;125(2):258-65.
- [25] Fischer G, Schneider EM, L Moldawer LL, Karcher C, Barth E, Suger-Wiedeck H, Georgieff M, Weiss M. CD64 surface expression on neutrophils is transiently upregulated in patients with septic shock. *Intensive Care Med*. 2001 Dec;27(12):1848-52.
- [26] Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, Krausz MM. Overexpression of the high-affinity Fc gamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock*. 2001 Aug;16(2):102-8.
- [27] Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995 Jan;273(2):117-23.
- [28] Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A, Gonzalez-Reimers E, Milena A, de la Vega MJ, Rodriguez-Rodriguez E, Gomez-Sirvent JL. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine*. 2001 Aug;15(4):232-6.
- [29] Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med*. 2004 Apr;30(4):605-11.
- [30] van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2001 Oct;1(3):165-74.
- [31] Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA*. 1995 Mar;273(12):934-41.
- [32] Woiciechowsky C, Schoning B, Lanksch WR, Volk HD, Docke WD. Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *J Mol Med*. 1999 Nov;77(11):769-80.
- [33] Volk HD, Reinke P, Falck P, Staffa G, Briedigkeit H, v. Baehr R. Diagnostic value of an immune monitoring program for the clinical management of immunosuppressed patients with septic complications. *Clin Transplantation*. 1989;3:246-52.
- [34] Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997 Jun;3(6):678-81.
- [35] Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, Manger D, Zuckermann S, Golosubow A, Nieter B, et al. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt*. 1991 Feb;(88):208-15.
- [36] Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg*. 1993

Feb;80(2):205-9.

- [37] van den Berk JM, Oldenburger RH, van den Berg AP, Klompmaier IJ, Mesander G, van Son WJ, van der Bij W, Sloof MJ, The TH. Low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation. *Transplantation*. 1997 Jun;63(12):1846-8.
- [38] Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med*. 2000 Feb;135(2):153-60.
- [39] Guillou PJ. Biological variation in the development of sepsis after surgery or trauma. *Lancet*. 1993 Jul;342(8865):217-20.
- [40] Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Docke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R, Volk HD. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med*. 1997 Feb;157(4):389-93.
- [41] Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1995 May;181(5):1887-92.
- [42] Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*. 1991 Dec;174(6):1549-55.
- [43] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov;174(5):1209-20.
- [44] Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995 Mar;85(5):1341-7.
- [45] Klava A, Windsor AC, Farmery SM, Woodhouse LF, Reynolds JV, Ramsden CW, Boylston AW, Guillou PJ. Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. *Arch Surg*. 1997 Apr;132(4):425-9.
- [46] Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Crit Care Med*. 2002 Dec;166(11):1475-82.
- [47] Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, Tracey KJ. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci*. 2000 Dec;85(1-3):141-7.
- [48] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May;405(6785):458-62.
- [49] Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002 Dec;420(6917):853-9.
- [50] Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, Liebenthal C, Wauer H, Kox W, Volk HD, Vogel S, Von Baehr R. Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med*. 1995 Dec;23(12):1976-83.
- [51] Tran DD, Groeneveld AB, van der Meulen J, Nauta JJ, Strack van Schijndel RJ, Thijs LG. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 1990 May;18(5):474-9.
- [52] Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*. 1995 Sep;274(12):968-74.
- [53] Gando S, Nanzaki S, Kemmotsu O. Disseminated intravascular coagulation and sustained systemic inflammatory response syndrome predict organ dysfunctions after trauma: application of clinical decision analysis.

- Ann Surg. 1999 Jan;229(1):121-7.
- [54] Bochicchio GV, Napolitano LM, Joshi M, Knorr K, Tracy JK, Ilahi O, Scalea TM. Persistent systemic inflammatory response syndrome is predictive of nosocomial infection in trauma. *J Trauma*. 2002 Aug;53(2):245-50.
- [55] Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B. *Chirurgie*. 2. Auflage. Thieme 2003.
- [56] Westaby S. Complement and the damaging effect of cardiopulmonary bypass. *Thorax*. 1983 May;38(5):321-5.
- [57] Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg*. 1997 Oct;85(4):766-82.
- [58] Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl K, Kuhlmann WD, Weinhold C. Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock*. 2001;16 Suppl 1:10-5.
- [59] Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1993 Feb;55(2):552-9.
- [60] Landow L, Andersen LW. Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1994 Oct;38(7):626-39.
- [61] McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. *Br J Anaesth*. 1995 Dec;75(6):724-33.
- [62] Kawamura T, Wakusawa R, Inada K. Interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonists increase during cardiac surgery. *Can J Anaesth*. 1997 Jan;44(1):38-42.
- [63] Kharazmi A, Andersen LW, Baek L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP. Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989 Sep;98(3):381-5.
- [64] Butler J, Parker D, Pillai R, Westaby S, Shale DJ, Rocker GM. Effect of cardiopulmonary bypass on systemic release of neutrophil elastase and tumor necrosis factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993 Jan;105(1):25-30.
- [65] Hill GE. Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1998 Apr;12(2 Suppl 1):21-5.
- [66] Wildhirt SM, Schulze C, Schulz C, Egi K, Brenner P, Mair H, Schutz A, Reichart B. Reduction of systemic and cardiac adhesion molecule expression after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Shock*. 2001;16 Suppl 1:55-9.
- [67] Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1983 Dec;86(6):845-57.
- [68] Okubo N, Hatori N, Ochi M, Tanaka S. Comparison of m-RNA expression for inflammatory mediators in leukocytes between on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Feb;9(1):43-9.
- [69] Al-Ruzzeh S, Hoare G, Marczin N, Asimakopoulos G, George S, Taylor K, Amrani M. Off-pump coronary artery bypass surgery is associated with reduced neutrophil activation as measured by the expression of CD11b: a prospective randomized study. *Heart Surg Forum*. 2003;6(2):89-93.
- [70] Michalopoulos A, Stavridis G, Geroulanos S. Severe sepsis in cardiac surgical patients. *Eur J Surg*. 1998 Mar;164(3):217-22.
- [71] Higgins TL, Estafanous FG, Loop FD, Beck GJ, Blum JM, Parandhi L. Stratification of morbidity and mortality outcome by preoperative risk factors in coronary artery bypass patients. A clinical severity score. *JAMA*. 1992 May;267(17):2344-8. Erratum in: *JAMA* 1992 Oct 14;268(14):1860.



- [72] Rinder CS, Mathew JP, Rinder HM, Tracey JB, Davis E, Smith BR. Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender. *J Lab Clin Med.* 1997 Jun;129(6):592-602.
- [73] Orita H, Shimanuki T, Fukasawa M, Inui K, Goto S, Washio M, Horikawa H. A clinical study of postoperative infections following open-heart surgery: occurrence and microbiological findings in 782 cases. *Surg Today.* 1992;22(3):207-12.
- [74] Bossink AW, Groeneveld J, Hack CE, Thijs LG. Prediction of mortality in febrile medical patients: How useful are systemic inflammatory response syndrome and sepsis criteria? *Chest.* 1998 Jun;113(6):1533-41.
- [75] Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bogel D, Fassbinder J, Reinhart K. Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 1999 Sep;27(9):1814-8.
- [76] Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 1999 Mar;37(3):363-8.
- [77] Hensel M, Volk T, Docke WD, Kern F, Tschirna D, Egerer K, Konertz W, Kox WJ. Hyperprocalcitonemia in patients with noninfectious SIRS and pulmonary dysfunction associated with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology.* 1998 Jul;89(1):93-104.
- [78] Reith HB, Mittelkötter U, Debus ES, Kussner C, Thiede A. Procalcitonin in early detection of postoperative complications. *Dig Surg.* 1998;15(3):260-5.
- [79] Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nylen ES, Snider RH, Simon GL, Goldberg RL, Becker KL. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Sep;83(9):3296-301.
- [80] Suprin E, Camus C, Gacouin A, Le Tulzo Y, Lavoue S, Feuillu A, Thomas R. Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU? *Intensive Care Med.* 2000 Sep;26(9):1232-8.
- [81] Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* 2000 Aug;28(8):2793-8.
- [82] Sablotzki A, Dehne MG, Friedrich I, Grond S, Zickmann B, Muhling J, Silber RE, Czeslick EG. Different expression of cytokines in survivors and non-survivors from MODS following cardiovascular surgery. *Eur J Med Res.* 2003 Feb;8(2):71-6.
- [83] Sablotzki A, Friedrich I, Muhling J, Dehne MG, Spillner J, Silber RE, Czeslick E. The systemic inflammatory response syndrome following cardiac surgery: different expression of proinflammatory cytokines and procalcitonin in patients with and without multiorgan dysfunctions. *Perfusion.* 2002 Mar;17(2):103-9.
- [84] Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J; Geneva Sepsis Network. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Crit Care Med.* 2001 Aug;164(3):396-402.
- [85] Spittler A, Razenberger M, Kupper H, Kaul M, Hackl W, Boltz-Nitulescu G, Fugger R, Roth E. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis.* 2000 Dec;31(6):1338-42.
- [86] Khabar KS, elBarbary MA, Khouqeer F, Devol E, al-Gain S, al-Halees Z. Circulating endotoxin and cytokines after cardiopulmonary bypass: differential correlation with duration of bypass and systemic inflammatory response/multiple organ dysfunction syndromes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Oct;85(1):97-103.
- [87] Hirai S. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Dec;9(6):365-70.
- [88] Myc A, Buck J, Gonin J, Reynolds B, Hammerling U, Emanuel D. The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 Mar;4(2):113-6.

- [89] Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1584-9.
- [90] Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 2000 Jul;96(1):218-23.
- [91] Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999 Aug;163(3):1537-44.
- [92] VanOtteren GM, Strieter RM, Kunkel SL, Paine R 3rd, Greenberger MJ, Danforth JM, Burdick MD, Standiford TJ. Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. *J Immunol.* 1995 Feb;154(4):1900-8.
- [93] Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in Sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):535-44.
- [94] Tamion F, Richard V, Bonmarchand G, Leroy J, Lebreton JP, Thuillez C. Induction of heme-oxygenase-1 prevents the systemic responses to hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 2001 Nov;164(10 Pt 1):1933-8.
- [95] Pellacani A, Wiesel P, Sharma A, Foster LC, Huggins GS, Yet SF, Perrella MA. Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1. *Circ Res.* 1998 Aug;83(4):396-403.
- [96] Downard PJ, Wilson MA, Spain DA, Matheson PJ, Siow Y, Garrison RN. Heme oxygenase-dependent carbon monoxide production is a hepatic adaptive response to sepsis. *J Surg Res.* 1997 Jul;71(1):7-12.
- [97] Yet SF, Pellacani A, Patterson C, Tan L, Foltz SC, Foster L, Lee WS, Hsieh CM, Perrella MA. Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock. *J Biol Chem.* 1997 Feb;272(7):4295-301.
- [98] Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995 Nov;13(5):595-601.
- [99] Chen YH, Yet SF, Perrella MA. Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003 May;228(5):447-53.
- [100] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci.* 2000 Aug;113 (Pt 16):2813-9.
- [101] Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol.* 2002 Jun;168(12):6404-11.
- [102] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

## ANHANG

### Danksagung

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Christian Blume danke ich für die viele Zeit, die er sich für meine Einarbeitung genommen hat.

Die Zusammenarbeit mit ihm war in vielerlei Hinsicht grundlegend wichtig für diese Arbeit.

Herrn Hans-Dieter Volk danke ich für die sehr gute Unterstützung und Betreuung, sowohl was die Erstellung dieser Arbeit anbetrifft, als auch in bezug auf die Durchführung der Präsentationen und der Publikationen.

Conny Höflich sei herzlichst gedankt für die gute Betreuung und ihre oftmals unentbehrliche Hilfe bei Problemen in der Laborarbeit (Durchflusszytometrie und ELISA) und in den Auswertungen der Daten. Ebenso war die Betreuung und die Hilfe von Katja Kotsch für zahlreiche labortechnische Belange in der molekularbiologischen Analytik unentbehrlich.

Christa Liebenthal stand mir mit Rat und oftmals auch mit Tat zur Seite. Ohne die Unterstützung der Mitarbeiter des Instituts, unter anderem Kristin Neuhaus, Katrin Vogt, Anke Bonke, Ingrid Jäkel, Ulrike Mönich und Annelie Dernier wäre vieles deutlich schwieriger gewesen. Auch möchte ich allen übrigen Institutskollegen für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima danken.

Die Unterstützung durch das Institut für Medizinische Biometrie war für die statistischen Auswertungen der Daten von grundlegender Bedeutung, die unkomplizierte Hilfe von Tania Schink eine große Freude.

Außerdem sei dem Team von Becton Dickinson Biosciences (Sponsor der Studie) und den Mitarbeitern des Deutschen Herzzentrums Berlin (Rekrutierung der Patienten) gedankt.

Nicht zuletzt gilt den Studienpatienten großer Dank für Ihre freundliche Bereitschaft, ihr Blut für die Untersuchungen zu spenden.

## Publikationen und Präsentationen

*Folgende Publikationen sind aus dieser Arbeit hervorgegangen:*

- Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. J.-C. Strohmeyer\*, C. Blume\*, C. Meisel, W.-D. Döcke, M. Hummel, C. Höflich, K. Thiele, A. Unbehauen, R. Hetzer, H.-D. Volk. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2003, 53B:54–62.
- Postoperative infectious complications are related to immunodepression mediated by the "inflammatory reflex" following endotoxin translocation - synergistic action of efferent vagus, sympathetic nerves, and adrenal gland. S. Rupprecht\*, C. Woiciechowsky\*, J.-C. Strohmeyer, C. Blume, M. Hummel, C. Höflich, T. Volk, K. Kotsch, W. Konertz, W. Kox, P. Reinke, R. Hetzer, H.-D. Volk. *Submitted in J Exp Med*, 2005.
- *Arbeitstitel:* Systemic immune activation, particularly neutrophilic activation, in long-term ventilated risk patients after cardiac surgery. C. Blume\*, J.-C. Strohmeyer\*, C. Meisel, W.-D. Döcke, M. Hummel, C. Höflich, K. Thiele, A. Unbehauen, R. Hetzer, H.-D. Volk. *(in Vorbereitung)*

*Folgende eigene Präsentationen auf Kongressen basieren auf dieser Arbeit:*

- Vortrag auf dem 7. Leipziger Workshop „Diagnostische Wertigkeit von Zellfunktionsparametern bei kardiochirurgischen Eingriffen“, 12.-13. April 2002
- Posterpräsentation auf der Euroconference „Interactions between innate and adaptive immunity in mammalian defense against bacterial infections“, 5.-8. Juni 2002 in Göttingen
- Posterpräsentation auf dem 6. Deutschen Interdisziplinären Kongress für Intensivmedizin und Notfallmedizin DIVI 2002, 13.- 16. November 2002 in Hamburg
- Posterpräsentation auf den Wiener Intensivmedizinischen Tagen „Die Infektionen des Intensivpatienten“, 20.-22. Februar 2003

---

\* beide Autoren trugen / tragen gleichermaßen zur Publikation bei

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die verwendete Literatur und sonstige Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Von den Laboruntersuchungen wurden die PCR-Messungen von mir, die durchflusszytometrischen und die ELISA-Messungen je zur Hälfte von Christian Blume (Doktorand) und mir durchgeführt.

Berlin, 08.06.2005